Lucien Ludwig · Apotheker

Ueber den Bitterstoff von Acorus Calamus

1941.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547621_0058

Ueber den Bitterstoff von Acorus Calamus

Inaugural-Dissertation

der

medizinischen Fakultät der Universität Bern

zur Erlangung der Würde eines

Doctor pharmaciae

vorgelegt von

Lucien Ludwig · Apotheker

Bern

Von der medizinischen Fakultät auf Antrag

des Herrn Prof. Dr. P. Casparis angenommen.

Bern, 14. Juni 1940. Der Dekan: Prof. Dr. J. Klaesi.

Buchdruckerei AG. Berner Tagblatt · Bern

1941

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meiner lieben Mutter

Meinem hochverehrten Lehrer

Herrn Prof. Dr. P. Casparis

möchte ich an dieser Stelle für die wohlwollende Förderung und die Unterstützung, die er meiner Arbeit zukommen liess, den herzlichsten Dank aussprechen.

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Universität Bern ausgeführt.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 9

II. Historisches 10

III. Pharmakochemisches über den Bitterstoff von Acorus Calamus .....

A Bisherige Untersuchungen 13

B Eigene Untersuchungen 20

1. Darstellung des Grundextraktes 20
2. Abtrennung des ätherischen Oeles 22
3. Chromatographie des Rohbitterstoffes 23
4. Reinigung des Rohbitterstoffes 30
5. Verseifung des Bitterstoffes 33
6. Verbesserte Darstellung des Bitterstoffes 36
7. Alkoholischer Anteil der Verseifungsprodukte 41
8. Säureanteil der Verseifungsprodukte 44
9. Zusammensetzung des Bitterstoffes 53
10. Untersuchung des Sterins 59

IV. Zusammenstellung der Resultate 61

Literaturverzeichnis 63

I. Einleitung

Rhizoma Calami, der Kalmus, nimmt wohl unter den Arzneidrogen, die in der Ph. H. V. aufgenommen wurden, eine besondere Stellung ein. Dies ist zwei Hauptgründen zuzuschreiben: erstens einmal ist der Kalmus eines der ältesten Heilmittel, welches heute immer noch Verwendung findet, andererseits, so merkwürdig es erscheinen mag, herrscht immer noch grosse Ungewissheit über die Frage der Bestandteile, die das Rhizom enthält. Besonders über den Bitterstoff sind die in der Literatur zu findenden Angaben noch sehr unterschiedlich.

Es schien daher reizvoll, der Frage nach den wirksamen Bestandteilen, unter besonderer Berücksichtigung des Bitterstoffes von Acorus Calamus L., etwas nachzugehen und Klarheit zu schaffen in den schon vorliegenden, sich widersprechenden Untersuchungen. Ich habe es in der nachstehenden Arbeit auf Anraten von Herrn Prof. Dr. P. Casparis unternommen, die Droge in dieser Richtung durchzuarbeiten.

II. Historisches

Acorus Calamus L. aus der Familie der Araceae ist eine ausdauernde, in gemässigten Klimaten über die ganze nördliche Erdhälfte verbreitete, hier und da auch kultivierte, an Fluss- und Teichufern und sumpfigen Orten Mitteleuropas überall wild wachsende Pflanze. Kalmus kommt ausser in Europa und Amerika auch in Japan, China, Burma, Ostindien, auf den Philippinen und einzelnen Inseln des Indischen Archipels vor; es ist auch in Abessinien am Tanasee gefunden worden. Als Heimat muss Südasien angenommen werden. Viele Standorte, besonders in Europa, verdanken ihre Entstehung der Verpflanzung und späteren Verwilderung.

Das wohlriechende aromatische Rhizom wurde schon im hohen Altertum im Morgenland als Gewürz und Heilmittel hoch geschätzt. Schon in der Frühzeit der indischen Medizin wurde die Droge im „*Ayur Veda Susrutas*" unter dem Sanskritnamen *Vacha* verwendet; noch heute ist *Bacha* die Bezeichnung für die Pflanze in den nordindischen Sprachen, im Arabischen *Wadsch*. Die Droge ist bis heute bei der Bevölkerung Indiens und Arabiens ein weitverbreitetes und geschätztes Heilmittel geblieben. Ebenfalls scheint der Kalmus in der altägyptischen Heilkunde eine hervorragende Rolle gespielt zu haben; im Alten Testament und anderen der ältesten Dokumente finden wir ihn erwähnt. Bei Theophrast, Dioskorides, Plinius, Plutarch und Strabo finden wir Beschreibungen der Pflanze und Angaben über deren Anwendung. In den Hippokratischen Schriften wird nur der äusserliche Gebrauch gegen Blähungen angegeben.

Jedenfalls wird im Altertum der Kalmus nur aus Asien nach Europa gebracht worden sein, und nur dieser indische Kalmus fand Verwendung in Europa bis zum 16. Jahrhundert. Um die Mitte des 16. Jahrhunderts gelangte dann die Droge bereits aus Russland und Siebenbürgen, wohin sie im 13. Jahrhundert durch die Tartaren eingeführt sein soll, zu uns und wurde vielerorts angebaut. Die Verbreitung in Europa nahm dann rasch zu, wobei zu erwähnen ist, dass die Pflanze zuerst in den Gärten gepflanzt wurde. So wurde

dann auch seit dieser Zeit ein Unterschied gemacht zwischen asiatischer und europäischer Kalmuswurzel, welcher Unterschied dann Ende des 17. Jahrhunderts fallen gelassen wurde, nachdem erkannt wurde, dass die Wurzel der bei uns wachsenden Pflanze der asiatischen gleichwertig sei. Doch ist in der Apothekertaxe des Rates von Halberstadt vom Jahre 1697 immer noch neben Calamus aromaticus verus (indischer Kalmus) auch Calamus aromaticus nostras (deutscher Kalmus), beide zu gleichen Preisen, zu finden.

Eine gute Abbildung der Pflanze finden wir zuerst in *Rheedes Hortus Malabaricus Amsterdameo 1678—1703.*

Das ätherische Oel wurde sicherlich bald nach dem Bekanntwerden der Wurzel bei uns destilliert, denn bereits 1582 findet es sich in der Taxe der Stadt Frankfurt.

Auch in Amerika wurde um 1783 von *I. O. Schopf* das Vorhandensein des Kalmus beobachtet, und zwar in New Jersey und Pennsylvania.

Heute ist unser Acorus Calamus nur von europäischer Abstammung, doch wird hie und da auf dem Drogenmarkt von London ein Kalmus indischer Herkunft feilgeboten.

Verwendung: Verwendet wird die Droge heute als Magenmittel, Stomachicum und als Aromaticum. Sie wird von der Schulmedizin nur mehr selten gebraucht, dagegen findet man sie nicht selten in Teemischungen aller Arten. In der Ph. H. V. ist sie Bestandteil der Species aromaticae, der Species carminativae, und wird zur Darstellung des Spiritus balsamicus, der Tinct. Absinthii comp., des Vinum diureticum verwendet. Ausserdem wird aus ihr die Tinctura Calami hergestellt.

Bestandteile: Ausser dem bitteren Anteil Acorin, dessen Untersuchung Gegenstand dieser Arbeit ist, enthält das Rhizom verschiedene isolierte und gut untersuchte Körper. Besonders reichlich ist ein ätherisches Oel vorhanden.

Das ätherische Oel, das 0,8 % der frischen und 1,5 bis 3,5 % der getrockneten Droge ausmacht, setzt sich aus ca. 73 % kristallisiertem Asaron, aus Asarylaldehyd, das der Träger des charakteristischen Geruches ist, aus Eugenol, aus zwei Kohlenwasserstoffen $C_{15}H_{22}$, aus n-Heptylsäure, aus Palmitinsäure und aus kristallisiertem Calameon zusammen[1]). Nach anderen Autoren soll es noch Kalmuskampher, $C_{15}H_{26}O_2$[2]), 5 % eines Terpens[3]), zwei unbekannte

Kohlenwasserstoffe, die d- und l-drehend sind[4]), ein Sesquiterpen[3]) und ein blaues Oel[5]) enthalten. Die Untersuchungsresultate sind je nach der Art des untersuchten Oeles (deutsches, russisches oder japanisches Oel) verschieden[1]), [6]).

Es wurde ausserdem in dem Rhizom ein alkaloidähnlicher Körper, *Calamin*, gefunden[7]), der je nach den Autoren Methylamin[8]), Trimethylamin[9]) oder Cholin[10]) sein soll. Wahrscheinlich sind alle drei vorhanden, teilweise aus Spaltung von Cholin entstanden. Ein Vorhandensein von Methylalkohol wird von Autoren angenommen[11]), [12]), von anderen aber bestritten[13]).

Die Droge enthält noch 0,76 % Dextrose und Kalmusgerbsäure[9]).

III. Pharmakochemisches über den Bitterstoff von Acorus Calamus

A Bisherige Untersuchungen

Wie schon in der Einleitung angedeutet wurde, sind über den Bitterstoff der Kalmuswurzel schon mehrere Arbeiten veröffentlicht worden, doch sind deren Resultate in solch einem Masse widersprechend, dass ein gründliches Studium der angewandten Methoden erforderlich war, um Gründe der verschiedenen Ansichten kennen zu lernen, und um daraus Schlüsse für unsere eigene Arbeit zu gewinnen.

August Faust war wohl der Erste, der den Kalmus zum Gegenstand einer chemischen Untersuchung machte. Im Jahre 1867 veröffentlichte er seine Resultate[14]).

Faust gewann seinen Bitterstoff, indem er ungeschälte Kalmuswurzel wiederholt mit Regenwasser auskochte, die abgepressten Flüssigkeiten eindampfte, dann mittelst Alkohol einen grossen Teil der hier gleichgültigen Körper fällte. Die abkolierte Flüssigkeit wurde dann mit Bleizucker und Bleiessig so lange vermischt, bis kein Niederschlag mehr entstand, dann abfiltriert und vom Blei mittelst Schwefelwasserstoff befreit. Durch Destillation wurde dann der filtrierten Flüssigkeit der Alkohol entzogen, mit Natronlauge alkalisch gemacht und mit Aether ausgeschüttelt. Die ätherischen Auszüge wurden vom Aether durch Destillation befreit, und es blieb ein weicher harzartiger Körper zurück, von der Farbe des gereinigten Honigs und einem Geschmack, der an Kalmus stark erinnerte. Die Ausbeute betrug 0,15 %.

Faust konnte diesen Körper, den er *Acorin* nannte, nicht in festen Zustand bringen. Weder monatelanges Stehen über Schwefelsäure, noch wochenlanges Erhitzen auf 100° C. vermochten das Acorin auszutrocknen. Es blieb in beiden Fällen eine klebrige Masse zurück. Langes und hohes Erhitzen bis auf ca. 120° C. trocknet den Körper zwar etwas mehr aus, scheint aber auch Zersetzung herbeizuführen, denn dabei wird die Farbe des Acorins dunkler bis

schwarz. Auch durch Fällung aus seiner ätherischen Lösung durch Benzol gewann *Faust* immer nur einen balsamartigen Körper.

Die Unmöglichkeit, diesen Körper kristallinisch oder in festem Zustand zu gewinnen, veranlasste *Faust*, von einer Elementaranalyse abzusehen, denn es schien ihm keine Sicherheit geboten, dass der betreffende Körper in genügender Reinheit vorhanden sei. Er begnügte sich deshalb mit folgender Charakteristik:

Das Acorin ist eine honiggelbe, weiche, harzartige Masse von bitterem aromatischem Kalmusgeschmack. Es löst sich leicht in Alkohol und Aether, ist aber aus ersterem durch Wasser, aus dem zweiten durch Benzol fällbar. In Alkohol färbt es rotes Lackmus ganz schwach blau. In Salzsäure ist es schwer, aber vollständig löslich, ohne die Säure zu neutralisieren. Eine solche Lösung, mit Chloriden des Goldes und des Platins vermischt, reduziert diese. Ferner wird Acorin gefällt durch Gerbsäure, Quecksilberjodid-Jodkalium und Jodwasser. Es entwickelt beim Glühen mit Natronkalk Ammoniak und reduziert Fehlingsche Lösung. Beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure spaltet sich das Acorin in Zucker und eine andere harzartige *N*-haltige Substanz, deren physikalische Eigenschaften ebenso unangenehm sind, wie die des Acorins. Auch Barytwasser bewirkt diese Spaltung.

Daraus zog *Faust* den Schluss, dass das Acorin ein *N*-haltiges Glykosid sei.

Es wurde dann, der Arbeit *Fausts* folgend, von *Hilger* die Ansicht vertreten, dass das Acorin vielleicht zu den Alkaloiden zu zählen sei[15]).

Um in diesen Fragen Klarheit zu schaffen, untersuchte dann *H. Thoms* das Rhizom[16]).

Was die Darstellung des Bitterstoffes anbetrifft, so versuchte *Thoms* eine eigene Methode auszuarbeiten. Um nicht mit allzu grossen Mengen Substanz und Lösungsmitteln arbeiten zu müssen, entzog er den Bitterstoff aus einer wässerigen Lösung mittelst Tierkohle, wobei er sich auf Arbeiten von *Hopf*, *Warrington*, *Weppen*, *Lebourdois*, *Bley* und *Kronmayer* stützte[17]).

Zu seiner Acorindarstellung benutzte *Thoms* ungeschälte, kleingeschnittene und gut ausgetrocknete Kalmuswurzel, die er mit Wasser eine Stunde lang auskochte, kolierte und abpresste. Diese stark bitter schmeckenden Auszüge wurden dann mit frisch ausgeglühter Knochenkohle unter häufigem Umschütteln digeriert, bis die Flüssigkeit nicht mehr bitter war.

Die Kohle wurde dann abfiltriert, mit Wasser ausgewaschen, mit 90 % Alkohol gekocht und das alkoholische Filtrat eingedampft, bis ein wässeriger Rückstand zurückblieb. Um die letzten Anteile ätherischen Oels zu entfernen, wurde dieser Rückstand auf dem Wasserbad erwärmt, dann mit Aether ausgeschüttelt. Nach Abdampfen des ätherischen Filtrates blieb eine honigartige, braune Masse zurück, die einen schwach aromatischen, an Kalmus erinnernden Geruch und stark bitteren Geschmack aufwies.

Die Ausbeute betrug 0,18 %, während eine geschälte Droge nur eine solche von 0,069 % aufwies.

Thoms stellte dann aus 12 kg frischer Kalmuswurzel nach oben behandelter Methode 22,25 g Acorin dar.

Im Gegensatz zu *Fausts* Untersuchungen konnte *Thoms* feststellen, dass sein Acorin keinen Stickstoff enthielt, indem weder beim Glühen mit Na oder K eine Cyan-Bildung entstand, noch Ammoniakentwicklung beim Glühen mit Natronkalk. Das Acorin von *Thoms* ist von neutraler Reaktion; in Wasser, verdünnten Säuren und Alkalien nicht löslich, hingegen spielend löslich in Aethyl-, Methylalkohol, Aether, Benzol, Toluol, Chloroform, Schwefelkohlenstoff, Azeton. *Thoms* konnte das Acorin auch nicht in feste oder kristallinische Form bringen, trotz Anwendung von Hitze, Kälte und Ausfällen mit verschiedenen Lösungsmitteln.

An Hand von Elementaranalysen des Acorins stellte *Thoms* für das Acorin die Bruttoformel $C_6 H_{10} O$ auf. Bei längerem Erhitzen des Acorins mit verdünnten Säuren oder Alkalien stellte *Thoms* fest, dass ein Geruch nach ätherischem Oel deutlich wahrzunehmen war, und dass dabei sich der Bitterstoff dunkler färbte. Im Filtrat wurde Fehlingsche Lösung reduziert, was er auf die Anwesenheit von Zucker zurückführte. So glaubte *Thoms* eine Spaltung des Bitterstoffes in der Richtung durchgeführt zu haben, dass die Spaltprodukte aus ätherischem Oel, Zucker und einem harzigen Körper bestehen würden. Er versuchte dann das Acorin mit verschiedenen Säuren und Alkalien zu spalten, um an Hand des Zuckergehaltes die Molekularformel zu ermitteln, doch da die Resultate sehr verschieden ausfielen, schloss er daraus, dass die Spaltung nur unvollkommen stattgefunden hätte. Um eine eventuell eintretende Oxydation des Acorins bei der Spaltung zu verhindern, wurde die Säure- und Alkalispaltung im Wasserstoffstrom durchgeführt, mit dem Erfolg, dass die Werte diesmal konstant ausfielen. Darauf gestützt glaubte *Thoms* folgende Gleichungen aufstellen zu können:

$$6\ C_6H_{10}O = 3\ C_{10}H_{16} + C_6H_{12}O_6$$

wonach die rationelle Formel des Acorins $C_{36}H_{60}O_6$ angenommen wurde.

Thoms untersuchte dann auch das bei der Spaltung auftretende ätherische Oel und stellte fest, dass dieses mit dem von *A. Kurbatov*[18]) eingehendst untersuchten Kalmus-Oel identisch war, sowohl in Hinsicht auf die physikalischen Werte, wie auch auf die chemische Zusammensetzung. *Kurbatov* hatte für das Kalmus-Oel die Formel $C_{10}H_{16}$ aufgestellt, welche Formel *Thoms* auch für das Spaltprodukt des Bitterstoffes gefunden hatte.

Auch dem bei der Spaltung des Acorins entstehenden harzigen Körper widmete *Thoms* seine Aufmerksamkeit. Dieser kratzend-bitter schmeckende, braune Körper ist von zähflüssiger Natur, von neutraler Reaktion und in Alkohol, Aether, Chloroform gut löslich, während er in Benzin unlöslich ist. Die Elementaranalyse ergab $C_{36}H_{58}O_7$. *Thoms* erklärte dieses damit, dass er annahm, dass diese Substanz, die er *Acoretin* nannte, aus dem Acorin unter Wasseraustritt infolge Oxydation entsteht.

$$C_{36}H_{60}O_6 + 2\ O = C_{36}H_{58}O_7 + H_2O$$

Eine weitere Oxydation konnte nicht bewirkt werden.

Thoms klärte dann die näheren Beziehungen zwischen ätherischem Oel, Bitterstoff und Harz auf, indem er das Acoretin zu Acorin reduzierte und dieses wieder in ätherisches Oel und Zucker spaltete.

Am Schluss seiner Arbeit drückt *Thoms* sogar die Vermutung aus, dass das in der Kalmuswurzel natürlich vorkommende Weichharz identisch mit dem Acoretin sei, wodurch der Zusammenhang Bitterstoff und ätherisches Oel zu einem sehr engen Begriff würde.

Die Ergebnisse *Thoms*' lassen sich folgendermassen zusammenstellen:

1. Das Acorin ist kein N-haltiges Glykosid.
2. Der Bitterstoff Acorin $C_{36}H_{60}O_6$ spaltet sich beim Behandeln mit verdünnten Säuren oder Alkalien im H-Strom, ferner durch Fermente in ätherisches Oel (Kalmusöl) und Zucker.

$$C_{36}H_{60}O_6 = 3\ C_{10}H_{16} + C_6H_{12}O_6$$

3. Das Acorin ist leicht oxydabel und geht unter Wasser-Abspaltung in ein indifferentes Harz Acoretin $C_{36}H_{58}O_7$ über.

4. Das in der Kalmuswurzel fertig gebildete Weichharz ist mit dem Acoretin identisch.
5. Acoretin wird durch Wasserstoff wieder zu Acorin reduziert nach folgender Formel:

$$C_{36}H_{58}O_7 + 4\ H = C_{36}H_{60}O_8 + H_2O$$

Die Untersuchungen von *Thoms* wurden aber schon 1887 von *A. Geuther*[19]) stark angegriffen. Anlass dazu gab ihm die Tatsache der ungewöhnlichen Zersetzung eines Glykosids in Zucker und einem sauerstofffreien Kohlenwasserstoff.

Die Darstellung des Bitterstoffes wurde von *Geuther* in der gleichen Art und Weise wie *Thoms* bewerkstelligt, mit der Ausnahme, dass er zum Entfernen des ätherischen Oeles, das von der Kohle ja stark adsorbiert wird, das Bitterstoff-Wassergemisch nicht wie *Thoms* einfach auf dem Wasserbad erhitzte, sondern es der Wasserdampfdestillation so lange unterwarf, bis kein ätherisches Oel mehr im Rückstand nachzuweisen war. Der Rückstand wurde dann mit Aether gelöst, vom Wasser getrennt, und der Aether eindunsten gelassen. Es hinterblieb ein gelbbrauner durchsichtiger Balsam von stark bitterem Geschmack und geringem, eigentümlichem, aber nicht an Kalmusöl erinnerndem Geruch zurück. Auch reagierte der Bitterstoff gegen Lackmus sauer.

Die Ausbeute von *Geuther* betrug 0,13 % gegen 0,18 % bei *Thoms*. Auch die Elementaranalysen von *Geuther* stimmten mit denen von *Thoms* nicht überein, denn er fand 3 % weniger C und 1 % weniger H, was er darauf hindeutete, dass *Thoms* bei seinem Verfahren das ätherische Oel nicht völlig aus seinem Bitterstoff hatte entfernen können.

Geuther untersuchte nun seinen Bitterstoff auf etwaigen N-Gehalt nach der Methode von *Dumas*[20]) und fand einen Gehalt an Stickstoff von 3,2 %.

Die von *Thoms* gefundene Spaltung des Acorins durch Kochen mit Säuren oder Alkalien in ätherischem Oel und Zucker wurde von *Geuther* überprüft, mit dem Resultat, dass sich dabei weder ätherisches Oel noch Zucker bildete.

Geuther untersuchte dann die beim Behandeln des Bitterstoffes mit Natronlauge entstehenden Zersetzungsprodukte. Er stellte dabei fest, dass der Bitterstoff in einen löslichen und einen unlöslichen Teil gespalten wird.

Die Elementaranalyse des Unlöslichen zeigte im Vergleich zu *Thoms*' Acoretin eine Zunahme an C und H, es ist sehr stark bitter und reagiert neutral, seine Bruttoformel ist $C_{40} H_{67} N O_7$, welche beinahe mit der des Acoretins übereinstimmt.

Der in Natronlauge lösliche Anteil des Bitterstoffes wurde von *Geuther* als eine Säure angesprochen. Diese Säure ist zu 36 % im Bitterstoff enthalten. Die alkalische Lösung der Säure wurde dann mit Salzsäure neutralisiert und mit Aether ausgeschüttelt, diese Lösung getrennt und vom Aether durch Verdunstenlassen befreit; es hinterblieb so eine braune, halbfeste, amorphe Masse, die sehr stark sauer reagierte. Die Elementaranalyse ergab $C_{11} H_{18} O_3$.

Geuther stellt den Befund von *Thoms*, dass das Acorin sich unter oxydativer Wirkung in Acoretin umsetzen könne, in Abrede, ebenso die Behauptung, dass man durch Reduktion des Acoretins wieder Acorin darstellen könne. Auch konnte er nie nachweisen, dass bei der Oxydation des Acorins oder bei der Reduktion des Acoretins sich Zucker und ätherisches Oel gebildet hätten.

Für *Geuther* ist das Acoretin von *Thoms* identisch mit seinem von Beimengungen von ätherischem Oel und von der freien Säure befreiten Bitterstoff.

Zusammenfassend können *Geuthers* Resultate wie folgt aufgefasst werden:

1. Das nach der Methode von *Thoms* dargestellte Acorin ist nicht eine N-freie Substanz, sondern enthält 3,2 % N.
2. Das Acorin von *Thoms* ist ein Gemenge von Bitterstoff, ätherischem Oel und Säure.
3. Beim Kochen mit Säuren oder Alkalien entsteht nie Zucker, sondern das beigemengte ätherische Oel destilliert ab, die Säure wird gebunden, und der unlösliche Rückstand bildet den Bitterstoff, welcher identisch ist mit *Thoms*' Acoretin.
4. Das Acoretin bleibt bei Reduktionswirkungen völlig unverändert.

Auf diese neuen Ergebnisse folgte eine Entgegnung von *Thoms*, der die Ansicht vertrat, dass durch die Wasserdampfdestillation, der *Geuther* seinen Bitterstoff ausgesetzt hatte, dieser habe zersetzt werden können, was zur Folge hätte, dass beide Forscher mit verschiedenen Bitterstoffen Untersuchungen angestellt hätten[21]). *Thoms* versuchte nun eine Darstellungsmethode ausfindig zu machen, welche ihm ermöglichen würde, sowohl Beimengungen des N-haltigen

Körpers, wie auch des ätherischen Oeles vom Bitterstoff fernzuhalten. Dabei wandte er *Draggendorfs* Analysengang an[22]).

Die Droge wurde mit Petroläther vom ätherischen Oel befreit, die noch bittere Droge dann mit absolutem Alkohol erschöpft. Die alkoholische Lösung wurde eingedampft und der bittere Rückstand mit kaltem destillierten Wasser extrahiert. Die wässerige Lösung wurde dann mittelst Bleiacetat von den Gerbstoffen befreit, dann das Blei durch Fällung mit $Na_2 SO_4$ gefällt. Um den fraglichen N-haltigen Körper abzutrennen, wurde die Lösung mit Kalium-Wismutjodidlösung versetzt, vom karminroten Niederschlag filtriert, das Filtrat dann mit $Na_2 Co_3$ neutralisiert, filtriert und nun das klare, gelbgefärbte, schwach aromatisch riechende Filtrat mit Knochenkohle geschüttelt. Die getrocknete Knochenkohle wurde dann mit Aether behandelt, bis dieser aus der Kohle nichts mehr herauszulösen vermochte, dann der Aether abgedampft. Es hinterblieb so eine geringe Ausbeute (aus 2,5 kg Droge ca. 1,5 g) eines honiggelben, aromatisch riechenden, sehr bitter schmeckenden Balsams.

Der Petrolätherauszug der Droge wurde ebenfalls zur Trockene eingedampft und es blieb eine ölige Flüssigkeit zurück, die 3,84 % der Droge ausmachte. Da nun nach Angaben von *Schimmel* die Kalmuswurzel nur bis 3,5 % ätherisches Oel enthält, so muss der Petroläther noch andere Bestandteile der Wurzel gelöst haben, vornehmlich, wie *Thoms* zeigte, Bitterstoff und ein alkaloidähnliches Produkt. Das Filtrat von der Knochenkohlebehandlung wurde auch untersucht, und *Thoms* fand darin eine Zuckerart, die er als Dextrose zu bestimmen vermochte.

Nun wandte sich *Thoms* der Untersuchung des von ihm auf oben angegebene Art dargestellten Bitterstoffs Acorin zu, den er als rein betrachtete. Sein nunmehriges Acorin ist von neutraler Natur und in Wasser sehr wenig löslich, es ist ein N-freier Körper. Die heisse wässerige Lösung trübt sich bei Zusatz von verdünnter Schwefelsäure unter Entwicklung eines stark duftenden ätherischen Oels. Nach Neutralisieren mit verdünnter Natronlauge, wobei sich die Lösung dunkler färbte, fand beim Erhitzen mit Fehlingscher Lösung eine Abscheidung von Cuprooxyd statt.

Thoms fand, dass die die Fehlingsche Lösung reduzierende Substanz kein Zucker war, wodurch er selbst seine früher angegebenen Zersetzungsgleichungen als irrtümlich betrachten musste. Er stellte dann fest, dass das Acorin beim Behandeln mit verdünnten

Säuren in ätherisches Oel, eine Harzsäure (sein früheres Acoretin) und einen Fehlingsche Lösung reduzierenden Körper, der kein Zucker ist, zerfällt.

Die Unterschiede der Untersuchungsergebnisse von *Geuther* glaubte *Thoms* auf zwei Möglichkeiten zurückführen zu können. Einerseits sei der von *Geuther* dargestellte Bitterstoff als nicht rein zu betrachten, andererseits wurde bei der Wasserdampfdestillation, der *Geuther* seinen Bitterstoff unterwarf, dieser zersetzt. Diese Zersetzung könnte erklären, warum *Geuthers* Bitterstoff sauer reagierte.

Weiter konnte *Thoms* sich auf eine Arbeit von *Kunz*[023]) und eigene Untersuchungen stützend, feststellen, dass der N-haltige Körper als Cholin zu betrachten sei. Da das Cholin sich besonders in sauren Medien beim Kochen leicht in Trimethylamin und Aethylenglycol spaltet, ist es erklärlich, dass *Geuther* nach seinem Verfahren einen N-haltigen Bitterstoff bekam, denn durch die Wasserdampfdestillation wurde nicht nur der Bitterstoff zersetzt, sondern auch das Cholin.

Aus keiner der vorstehend genannten Untersuchungen geht hervor, dass das von verschiedenen Forschern dargestellte Acorin ein einheitlicher und reiner Körper war. Deshalb sind auch die Angaben über dessen Spaltung und Umsetzungen nicht beweisend. Eine erneute Untersuchung des Kalmus-Bitterstoffes erschien daher wünschenswert.

B Eigene Untersuchungen

I. Darstellung des Bitterstoffes von Acorus Calamus.

Zur Bearbeitung gelangte eine im Sommer 1937 gesammelte Droge, die uns von der Firma A. G. vorm. B. Siegfried in Zofingen geliefert wurde. Es handelte sich um ein Rhizoma Calami mundata IV. Eine geschälte Droge fand Verwendung, weil eine solche weniger ätherisches Oel enthält als die ungeschälte, indem die Oelzellen besonders in der Rinde stark angehäuft sind, während andererseits die mundierte Wurzel prozentual mehr Bitterstoff zu enthalten scheint.

Unsere erste Absicht war, mittels Petroläther die Droge vom ätherischen Oel zu befreien, um dann anschliessend zu versuchen,

den Bitterstoff mit verschiedenen Lösungsmitteln zu extrahieren. Es stellte sich dabei heraus, dass der Petroläther (es wurde nur die Fraktion bis 55° C. verwendet) nebst dem ätherischen Oel auch Bitterstoff der Kalmuswurzel zu entziehen vermag, indem zur vollständigen Extraktion des ätherischen Oels so lange mit Petroläther extrahiert werden muss, dass dabei eine gewisse Menge Bitterstoff mitgelöst wird. Vorversuche zeigten, dass bei genügend langer Extraktionsdauer mit Petroläther der gesamte Bitterstoff der Droge entzogen werden kann. Deshalb entschlossen wir uns, die Droge mit Petroläther bis zu deren Erschöpfung an ätherischem Oel und bitteren Bestandteilen zu behandeln.

Ein Versuch, die Droge vom ätherischen Oel mittels Wasserdampfdestillation des in Wasser suspendierten Pulvers der Wurzel zu befreien, scheiterte daran, dass durch Anwendung von Wärme und Wasser die Droge so verkleistert wurde, dass es nicht mehr möglich war, ihr in feuchtem oder trockenem Zustand den Bitterstoff durch Lösungsmittel zu entziehen.

a) Petrolätherextrakt.

5 kg der vorher erwähnten gepulverten Droge wurden in einem nach dem Soxhlet'schen Prinzip gebauten Apparat mit Petroläther (Fraktion bis 55° C.) extrahiert. Nach ca. 60 Stunden kontinuierlicher Extraktion war die Droge frei von ätherischem Oel und Bitterstoff. Der Petroläther-Auszug wurde bis zu einer Menge von 4 Liter bei 60° C. destilliert und dann im Vakuum vom restlichen Petroläther befreit. Es hinterblieben 240,0 g einer öligen Flüssigkeit, die sehr stark den aromatischen Geruch des Oleum calami besass. Das extrahierte und getrocknete Drogenpulver wurde dann noch auf einen eventuellen Gehalt an Bitterstoff geprüft, indem jeweils 70,0 g Droge je mit Aether, Benzol, Methylalkohol, Aethylalkohol, Essigäther, Azeton perkoliert wurden. Sämtliche auf diese Art gewonnenen Extrakte waren vollständig unbitter, was den Beweis erbrachte, dass die Droge durch die Petrolätherextraktion an Bitterstoff erschöpft war.

Der Petrolätherextrakt, den wir von nun an, der Einfachheit halber, als Grundextrakt I bezeichnen werden, enthält nebst ätherischem Oel und Bitterstoff noch andere Ballaststoffe. Er ist dunkelbraun-rot gefärbt, brennend bitter schmeckend und von öligflüssiger Natur.

b) Abtrennung des ätherischen Oeles.

Die Kernfrage war nun, wie das ätherische Oel vom Bitterstoff zu trennen sei. Da sich zeigte, dass Bitterstoff und ätherisches Oel gegen organische Lösungsmittel gleiches Verhalten aufweisen, war es nicht möglich, sie auf diese Art zu trennen. Auch eine Extraktion mit Wasser kann nicht in Frage kommen, da der Bitterstoff nur im Verhältnis 1 : 1000 in Wasser löslich ist. Es wurde die Möglichkeit einer Trennung des ätherischen Oeles mittelst der üblichen Wasserdampfdestillation geprüft.

Ca. 100 g des Grundextraktes I wurden während mehr als 50 Stunden der Wasserdampfdestillation unterworfen, bis alles ätherische Oel destilliert war. Dabei änderte sich die ursprüngliche orange-braune Farbe des Wasserextrakt-Gemisches zu einer schwarzbraunen, was schon rein äusserlich auf eine Zersetzung deuten liess.

Der so vom ätherischen Oel befreite bittere Anteil des Grundextraktes I wurde zum Beweis, dass eine Zersetzung stattgefunden hatte, nach später erläuterter Weise mittelst der chromatographischen Analyse geprüft, und das Resultat bewies eindeutig, dass eine weitgehende Spaltung stattgefunden hatte. Damit war aber auch die Unbrauchbarkeit dieser Destillationsmethode für unseren Zweck erbracht. Wir versuchten dann die chromatographische Adsorptionsmethode in unserem Falle anzuwenden[25]).

Um diese Methode für unsere Arbeit anwenden zu können, wurden Vorversuche sowohl mit verschiedenen Lösungsmitteln, wie auch mit verschiedenen Adsorbentien angestellt. Als Lösungsmittel wurden Petroläther, Essigäther, Benzol und Chloroform ausprobiert, wobei der Petroläther die besten Resultate zeitigte. Dagegen zeigten sich Aethyl- und Methylalkohol und Aether als vorzügliche Elutionsmittel. Zur Wahl des Adsorbens wurden Versuche mit Aluminium oxyd. anhydr., Calcium carbonic. ppt., Natrium sulfuric. sicc., Saccharum und Magnesium oxydatum durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass sich das Aluminium oxyd. anhydr. am besten eignete. Um dieses noch in seiner Wirkung zu verstärken, wurde es nach dem Vorschlag von *Ruggli* mit Brunnenwasser aktiviert.

Dieses aktivierte Aluminiumoxyd erwies sich für unsere Zwecke als sehr geeignet, denn es zeigte sich, dass es aus der Petrolätherlösung die bitteren Bestandteile sehr stark adsorbierte, während das ätherische Oel nur sehr schwach festgehalten wurde.

Nachdem durch die verschiedenen Vorversuche das dargestellte Grundextrakt I aufgebraucht worden war, wurde nach oben beschriebener Methode 10 kg Rhizoma Calami mundata III mit Petroläther (Fraktion bis 55° C.) im erwähnten Apparat ausgezogen. Um einen längeren Wärmeeinfluss auf die extrahierten Petroläther-Auszüge zu verhindern, wurden diese Auszüge nach ca. 4 Stunden Extraktion entfernt und durch neuen Petroläther ersetzt. Nach Erschöpfung der Droge von ätherischem Oel und Bitterstoff wurden die Auszüge zusammengebracht und im Vakuum vom Petroläther befreit. Es wurden auf diese Weise ca. 500,0 g Grundextrakt I von orange-gelber Farbe gewonnen.

c) Chromatographie des Petrolätherextraktes.

200,0 g des Grundextraktes wurden in ca. 4 Liter Petroläther gelöst. Dabei konnte festgestellt werden, dass das Extrakt sich in einer kleinen Menge des Lösungsmittels vollständig löste, während es sich auf Zusatz weiterer Mengen Petroläthers zu trüben anfing und bald ein feiner Niederschlag sich niedersetzte. Bei der oben angegebenen Verdünnung ist dieses Ausfallen quantitativ, denn die vom braunen Niederschlag filtrierte Lösung trübte sich auf weiteren Zusatz von Petroläther nicht mehr. Der braune zähfeste, unbittere, ausgefallene Körper hat harzigen Charakter, weshalb wir ihn als *Harz I* bezeichnen möchten. Er ist in den meisten organischen Lösungsmitteln leicht löslich.

Die vom *Harz I* abfiltrierte Lösung des Grundextraktes war nun klar hellgelb. Zur Chromatographie wurde eine Röhre benützt von 650 mm Länge und 45 mm Durchmesser, wobei die Röhre unten in einer Nutsche hermetisch befestigt wurde, welche ihrerseits auf eine grosse Saugflasche zu stehen kam. Das Füllen der Röhre wurde so durchgeführt, dass das Aluminiumoxyd mit Petroläther aufgeschwemmt wurde, und diese Aufschwemmung in sehr geringen Portionen, unter Anwendung eines schwachen Vakuums, in das mit Petroläther vorher gefüllte Rohr gebracht wurde. Durch diese Methode konnte eine Säule hergestellt werden, die fest und gleichmässig war und keine Luftbläschen aufwies. Die Röhre wurde bis ca. 5 cm vom Ende gefüllt und erforderte 1,5 kg Aluminiumoxyd, das zu füllen ca. 3—4 Stunden in Anspruch nahm. Die immer noch nasse Röhre wurde dann mit der Extraktionslösung beschickt, wobei geachtet werden musste, dass das Aluminiumoxyd immer

mit Flüssigkeit bedeckt war. Das Saugen wurde so reguliert, dass per Minute ca. 100—150 Tropfen durchflossen. Die Säule reichte genau um alles zu adsorbieren, denn der unten ausfliessende Petroläther floss noch klar und rein heraus, wenn die letzten Anteile zur Adsorption oben hineingebracht wurden. Unmittelbar daran wurde mit reinem Petroläther die Säule entwickelt. Zu diesem Zweck wurden ca. 8 Liter Petroläther benützt. Es stellte sich bald heraus, dass die unten ausfliessende Flüssigkeit hellgelb aussah, was so lange dauerte, bis ca. 6 Liter entwickelt waren, dann war der austretende Petroläther wieder klar und rein. Trotzdem wurde das Entwickeln noch fortgesetzt bis ca. 8 Liter nachgegossen waren. Die gelbe durchgeflossene Petrolätherlösung, ca. 6,7 Liter, wurde im Vakuum eingedampft und es blieb eine ölige, gelbe, in dicker Schicht bräunlichgelb erscheinende Flüssigkeit zurück. Der Geruch war der für die Kalmuswurzel charakteristische, angenehm aromatische, der Geschmack scharf, nach kurzer Zeit intensiv kratzend, auf alle Fälle nicht bitter. Die Ausbeute betrug 79,50 g, was einem Prozentgehalt auf die Wurzel berechnet von 1,98 entspricht.

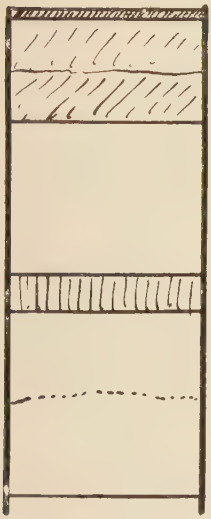
Es handelt sich hier um das ätherische Oel der Kalmuswurzel, während der Bitterstoffanteil der ursprünglichen Petrolätherlösung in der Säule zurückblieb. Was den prozentualen Gehalt an ätherischem Oel anbetrifft, so stimmt dieser mit dem des Grundextraktes I überein. Durch Wasserdampfdestillation konnte das ätherische Oel dem Grundextrakt I entzogen und quantitativ bestimmt werden. Das Resultat war 2,01 %.

Das aus der Adsorptionssäule entwickelte ätherische Oel wurde nach Angaben von *Beckstroem*[25]) untersucht, und es erwies sich, dass es mit dem von *Beckstroem* untersuchten Oleum Calami übereinstimmte.

Die vom ätherischen Oel befreite Säule zeigte verschiedene unterschiedlich gefärbte Zonen von gelber bis gelb-brauner Farbe, deren Uebergänge mit dem blossen Auge nicht genau festgestellt werden konnten. Um sie sichtbar zu machen, wurde die chromatographische Röhre unter der Quarzlampe untersucht. Zuerst wurde sie durch starkes Vakuum feucht gesogen und dann im Ultraviolett-Licht betrachtet. Nach kurzer Beleuchtung fingen einzelne Zonen zu fluoreszieren an, und es konnten Differenzierungen in der Säule beobachtet werden. Es muss dabei aber gesagt werden, dass die Unterschiede im Aufleuchten nicht sehr scharf waren, und so die Zerschneidung der Säule nicht leicht erschien. Einzelne Zonen waren

ziemlich scharf abgegrenzt, andere dagegen schienen ineinander zu fliessen.

Die Fluoreszenzen ergaben das untenstehende Bild. Dabei haben wir nur die eindeutig ausgebildeten Zonen berücksichtigt, welche ihrerseits infolge von Mischfluoreszenzen nicht als einheitlich betrachtet werden dürfen.



	Aussehen (Quarzlampe)	Al_2O_3-Menge
Schicht 1.	Gemisch aus 2 Fluoreszenzen; leuchtet braun-gelb.	300,0 g
Schicht 2.	Uneinheitlich, mindestens 2 verschiedene Zonen; leuchtet hellblau.	500,0 g
Schicht 3.		100,0 g
Schicht 4.	Die Fluoreszenzen fliessen ineinander; leuchtet hellgelb auf.	500,0 g

Fig. 1

d) Trennung der Schichten.

Die Trennung der einzelnen Schichten war sehr schwer, da die Fluoreszenzen nicht alle scharf abgegrenzt waren. Die vier abgebildeten Zonen erscheinen sehr markant, enthalten aber alle noch Nebenfluoreszenzen, so dass sie keineswegs einheitlich sind.

Nach Ausstossen der Säule aus dem Glasrohr wurden die vier Zonen getrennt, in Erlenmeyerkölbchen gebracht und eluiert. Als Elutionsmittel eignete sich eine Mischung von 8 Teilen Alkohol, 1 Teil Methylalkohol und 1 Teil Aether vorzüglich *(Alkohol-Aether-Gemisch)*. Das Aluminiumoxyd wurde nun mit dieser Mischung zuerst kalt und dann noch warm ausgezogen, bis keine adsorbierten Bestandteile mehr herausgelöst werden konnten. Alle vier Auszüge zeigten nach der Filtration eine hellgelbe Farbe, die mehr oder

weniger, je nach der Schicht, in Braun überging. Die Eluate wurden dann bei einer 40° C. nicht übersteigenden Temperatur im Vakuum eingedampft, der Rückstand mit Aether aufgenommen und in Kristallisierschalen bei normaler Temperatur vom Aether befreit.

Das eluierte Aluminiumoxyd wurde zur Kontrolle noch einmal unter die Quarzlampe gebracht und zeigte immer noch eine stark hellgelb-weisse Fluoreszenz, was darauf schliessen liess, dass es immer noch Bestandteile des Grundextraktes I enthielt, allerdings schien jetzt die Fluoreszenz bei allen vier Schichten gleich zu sein, was die Vermutung aufkommen liess, dass in allen vier Schichten trotz Elution ein gleicher Körper festgehalten war.

Um diesen Körper zu lösen, wurde das Aluminiumoxyd mit 0,5 n Natronlauge behandelt. Diese wässerige Masse wurde dann mit Aether ausgeschüttelt. Es war so möglich, die Adsorptionsfähigkeit des Aluminiumoxyds zu verändern, und der Aether konnte jetzt die sehr stark adsorbierten Bestandteile herauslösen. Diese ätherische Lösung wurde dann mit Wasser gewaschen, bis sie nicht mehr alkalisch reagierte, mit Natrium sulfuric. sicc. getrocknet, filtriert und vom Aether abgedampft. Es hinterblieb ein fettähnlicher, graugelber Rückstand, der alle Eigenschaften eines Fettes aufwies, und der keinen bitteren Geschmack mehr aufwies. Die Menge betrug ca. 45 g (Fett I).

Nachdem der Aether von den vier Eluaten abgedunstet war, sahen die getrennten Bestandteile wie folgt aus:

Schicht 1 stellt eine dunkelbraune, zähharzige Masse dar, die geruch- und geschmacklos ist. Ausbeute 10,0 g.

Schicht 2 honigartige, braune Flüssigkeit von stark bitterem, wenig brennendem Geschmack. Menge 14,0 g.

Schicht 3 zähe, braune, schwach bitter schmeckende Masse mit einem eigentümlich aromatischen Beigeruch wie ranzige Butter. Ausbeute 6 g.

Schicht 4 honigweiche, hellgelbe, sehr bitter schmeckende Masse, die reichlich mit Kristallen durchsetzt ist. Ausbeute 40,0 g.

Aus dieser ersten Zerlegung des Grundextraktes geht erstens hervor, dass durch die Adsorption mit Aluminiumoxyd mit nach-

folgendem reichlichem Entwickeln das ätherische Oel hat entfernt werden können, was durch die Abwesenheit des Geruches nach ätherischem Oel in den vier Schichten bewiesen ist. Anderseits ist der vom ätherischen Oel getrennte bittere Extrakt noch kein einheitlicher Körper, sondern eine Mischung von amorphen, kristallinischen, bitteren und nicht bitteren Bestandteilen. Ein beträchtlicher Teil des gesamten Petrolätherextraktes, d. h. 45,0 g, besteht aus einem fettähnlichen Körper, wie aus obenerwähnter Untersuchung hervorgeht.

e) Untersuchung der Eluate.

Wir haben nur die bitteren Schichten 2, 3 und 4 untersucht, da ja die Schicht 1 wegen ihres nicht bitteren Charakters ausser Betracht fällt.

Schicht 4. Das Eluat bestand, wie erwähnt, aus einem Gemenge von Kristallen und einer honigartigen Masse. Deshalb wurde die letztere von den Kristallen abgesaugt. Dieses Abnutschen musste dreimal durchgeführt werden, da infolge der Zähigkeit der Masse diese durch Zusatz von Alkohol filtrierfähig verdünnt werden musste, was aber auch zur Folge hatte, dass sich dabei kleine Mengen der Kristalle lösten, welche dann wieder auskristallisiert gelassen werden mussten, bevor eine neue Filtration stattfinden konnte. So konnten ca. 10,0 g Kristalle gewonnen werden. Der Rest von ca. 29,0 g blieb honigartig, ohne dass sich neue Kristalle gebildet hätten. Die gereinigten Kristalle besassen keinen bitteren Geschmack, während die amorphe Masse sehr stark bitter war. Damit war der Beweis erbracht, dass die kristallinischen Einlagerungen anderer chemischer Natur seien als der bittere Anteil der Schicht 4. Von den Kristallen wird später die Rede sein (siehe Seite 58).

Schicht 2 und 3. Obschon diese Schichten ebenfalls bitter schmeckten, war damit nicht erwiesen, dass sie denselben Bitterstoff enthielten, wie Schicht 4. Sie wurden daher gesondert aufgearbeitet.

Wir versuchten zunächst noch einmal, jedes Eluat der drei Schichten für sich zu chromatographieren, um so eine neue Trennung durchzuführen.

Die Eluate 4, 3 und 2 wurden (das erstere von den erwähnten Kristallen befreit) je für sich in Petroläther aufgelöst, wobei sich bei allen drei eine Trübung bemerkbar machte, die, abfiltriert, nach ihrem Verhalten gegen Lösungsmittel und nach ihrem Aussehen mit dem Harz I (siehe Seite 23) übereinstimmte. Die filtrierten klaren Lösungen wurden dann chromatographiert und längere Zeit mit Petroläther entwickelt.

Unter die Quarzlampe gebracht, konnten folgende Säulenbilder gesehen werden:

Schicht 2

Unter der Quarzlampe.

2a — Braune geringe Zone.

2b — 2 hellweiss-bläuliche Unterschichten. Fluoreszenzdifferenzen sehr gering.

Schicht 3

3a — Hellblau-weisse Zone

3b — Hellgelb-braun

3c — Hellgelb-weiss

Schicht 4

Braune geringe Zone (Verunreinigungen)

4a Stark hellweiss-gelblich aufleuchtend

4b Bläulich-weiss.

Fig. 2

Beim ersten Anblick fiel auf, dass die Farben der verschiedenen Unterschichten nicht sehr verschieden waren, auch kann man annehmen, dass die Schicht 3 zur Hauptsache aus einem Teil der Schicht 4 (4a) und einem Teil der Schicht 2 (2b) besteht, was darauf zurückzuführen wäre, dass beim ersten Zerschneiden der Röhre, in die Schicht 3 jeweils Teile von den Schichten 4 und 2 mitgenommen wurden, was bedingt war durch die nicht scharf auftretenden Fluoreszenzen. Die verschiedenen Schichten wurden dann mit folgenden Resultaten eluiert:

Schicht 4. Unter der Quarzlampe konnte man (vgl. Fig. 2) nebst der obern braunen Schicht, die Verunreinigungen zuzuschreiben ist, zwei verschiedene Zonen feststellen, die, wenn schon scharf abgegrenzt, doch in der Grundfarbe nicht sehr verschieden sind. Durch Elution mit dem Alkohol-Aether-Gemisch (siehe Seite 25) und nach Eindampfen dieser Lösung im Vakuum, hinterblieben zwei honigartige Substanzen (4a und 4b), die beide sehr bitter schmeckten, geruchlos waren, und von welchen die Schicht 4b geringe kristallinische Einlagerungen aufwies. Die Vermutung lag nahe, dass es sich hier um Reste der Kristalle handelt, die mechanisch durch Abnutschen nicht vollständig von der Schicht 4 hatten getrennt werden können. Nach Entfernung dieser wenigen Kristalle schienen die Eluate 4a und 4b, was Aussehen, Geschmack und

Geruch anbetrifft, identisch zu sein. Auch eine kleine chromatographische Probe von der gereinigten Schicht 4b zeigte eine Fluoreszenz, die hellweiss war und so der Fluoreszenz von 4a ähnlich war. Aus diesem Grunde ist anzunehmen, dass die Eluate 4a und 4b identisch sind.

Schicht 3. Sie schien aus den Schichten 4a und 2b zu bestehen, nebst einem eigenen Produkt 3b. Die eluierten Produkte bestätigten auch diese Vermutungen, die sich auf die Fluoreszenz-Aehnlichkeit stützen, indem 3c, bzw. 3a, in Farbe, Geschmack und Konsistenz 4a, bzw. 2b, ähnlich waren. Das Produkt der Schicht 3b war braun, zähe, von bitterem Geschmack und eigentümlichem Aroma.

Schicht 2. Sie leuchtete uneinheitlich auf, aber die Fluoreszenzverschiedenheiten waren so gering, dass eine Trennung in die Zonen 2a und 2b sehr schwierig war. Beide Eluate waren, rein äusserlich betrachtet, von der gleichen braungelben, honigartigen, zähen Konsistenz. Der Geschmack war bitter-brennend.

Bei dieser zweiten Adsorptionsversuchsreihe fällt auf, dass fast keine Verluste entstehen, dass also durch Elution dem Aluminiumoxyd beinahe quantitativ die adsorbierten Bestandteile entzogen werden können, was darauf schliessen lässt, dass das Fett I bei der ersten Adsorption quantitativ aus dem Bitterstoff-Gemisch entfernt worden ist.

Alle diese ersten Versuche lassen verschiedene Schlüsse und Vermutungen zu. Einerseits schien es uns, dass eine weitere Reinigung des bitteren Extraktes mittelst der chromatographischen Methode in diesem unserem Falle wohl im Kleinen zu einem Erfolg, doch im Grossversuch zu keinem weiteren Ziel führen kann, da die Trennungen der Schichten in grossem Masse solch technische Schwierigkeiten bieten, dass es nie zu einer eindeutigen Trennung der verschiedenen Bestandteile kommen kann. Anderseits ist die chromatographische Methode mit ziemlich grossen Verlusten verbunden, was in unserem Falle, da wir verhältnismässig kleine Mengen zur Verfügung haben, sich nachteilig auswirkt.

Deshalb wurde versucht, die Reinigung des bittern Anteiles auf einem anderen Weg durchzuführen.

f) Untersuchung des vorgereinigten Bitterstoffes.

Die durch die chromatographische Methode vorgereinigten bitteren Anteile des Grundextraktes I von Acorus Calamus wurden nun in folgenden Richtungen untersucht:

1. Löslichkeitsverhältnisse.

Die Produkte der Schichten 4, 3 und 2 sind leicht löslich in Aether, Petroläther, Essigäther, Benzol, Methyl- und Aethylalkohol. Alle Versuche mittelst verschiedenen Lösungsmitteln, sei es durch Auskristallisierenlassen oder Fällen, den Bitterstoff in kristallinische Form zu erhalten, schlugen fehl.

2. Vakuum-Destillation.

Im Hochvakuum (0,044 mm Hg) wurden die Bitterstoffe 4, 3 und 2 destilliert. Bei einer Temperatur von 170—180° C. destillierten jeweils einige Tropfen einer orangeroten Flüssigkeit über, doch unter der Wirkung der Wärme färbten sich die Bitterstoffe allmählich dunkler, was auf eine Zersetzung hindeutet.

3. Verhalten gegen verdünnte Säuren.

In der Kälte verhielten sich die Bitterstoffe gegen verdünnte Säuren (Salz- oder Schwefelsäure) indifferent, bei Anwendung von Hitze schieden sich harzartige, schwarze Bestandteile aus, ohne dass indessen der Geruch nach ätherischem Oel wahrnehmbar gewesen wäre, wie dies *Thoms* von seinem Bitterstoff erwähnt.

4. Verhalten gegen verdünnte Alkalien.

Durch Vorversuche konnte festgestellt werden, dass eine ätherische Lösung der Bitterstoffe sowohl von verdünnter Natronlauge, wie auch von Natriumkarbonat-Lösung angegriffen wurde. Durch Ausschütteln dieser ätherischen Bitterstofflösungen mittelst 5 %iger Natriumkarbonat-Lösungen wurde ein Teil des Bitterstoffes gebunden. Die zurückbleibende ätherische Lösung, die immer noch gelb gefärbt war, wurde dann mit 1 %iger Natronlauge ausgeschüttelt, und es zeigte sich, dass das Alkali einen weiteren Anteil herauszulösen vermochte.

Aus diesen Vorversuchen konnte man schliessen, dass die verschiedenen Produkte der Schichten 4, 3 und 2 an Hand ihrer Reaktionsfähigkeit gegen verdünnte Alkalien getrennt oder gereinigt werden könnten. Die Frage blieb offen, ob die durch Alkalien gebundenen Bestandteile den bitteren Anteil bilden oder nur Verunreinigungen davon sind. Deshalb wurden jeweils die Schichten 4, 3 und 2 nach folgender Methode behandelt.

Ca. 0,2 g der Substanz wurden in 20 ccm Aether gelöst, viermal mit je 10 ccm 5 %iger Natriumkarbonatlösung kräftig geschüttelt und jeweils die Karbonatlösung von der Aetherschicht getrennt. Nachdem die letzte Natriumkarbonatausschüttelung aus der ätheri-

schen Lösung keine Bestandteile herauslöste, indem eine kleine Probe sich beim Ansäuern nicht mehr trübte, wurden die vereinigten Ausschüttelungen mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, die nun trübe Lösung mit Aether ausgeschüttelt, von der wässerigen Schicht abgetrennt und so lange mit Wasser gewaschen, bis keine SO_4-Jonen mehr nachweisbar waren. Die ätherische Lösung wurde dann mit getrocknetem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und bei normaler Temperatur vom Aether befreit. Der Rückstand entspricht den freien Säuren, die sich im Bitterstoffgemisch befinden = *Säure A.*

Die so behandelten Lösungen der Bitterstoffe wurden nun genau gleich wie oben angegeben, statt mit Natriumkarbonatlösung mit 1 %iger Natronlauge behandelt. Die Ausarbeitung der Ausschüttelungen erfolgte in gleicher Weise wie bei den Natriumkarbonatausschüttelungen. Der auf diese Weise getrennte Bestandteil des Bitterstoffes entspricht den freien phenolischen Anteilen des Bitterstoffes = *Phenol B.*

Die zurückbleibende ätherische Lösung wurde seinerseits mit Wasser gewaschen, getrocknet, filtriert und vom Aether befreit. Es blieb ein Stoff zurück, den wir infolge seines bitteren Geschmackes als gereinigten Bitterstoff bezeichnen wollen = *Bitterstoff C.*

Bei allen drei Eluaten 4, 3 und 2 liessen sich diese drei Bestandteile isolieren, jedoch waren die Mengenverhältnisse verschieden. Die nachfolgende Zusammenstellung gibt über Mengenverhältnisse, Aussehen und andere Eigenschaften der einzelnen Fraktionen Auskunft.

	Aussehen	Menge	Geschmack	Geruch
Schicht 4.				
A. Säure	braungelb (Harz)	ca. 0,02	unbitter	—
B. Phenol	dunkelbraun (Harz)	ca. 0,06	schwach bitter	aromatisch
C. Bitterstoff	hellgelb (Honig)	ca. 0,12	stark bitter	geruchlos
Schicht 3.				
A. Säure	braungeld (Harz)	ca. 0,04	unbitter	—
B. Phenol	dunkelbraun (Harz)	ca. 0,08	schwach bitter	aromatisch
C. Bitterstoff	hellgelb (Honig)	ca. 0,08	s. stark bitter	geruchlos
Schicht 2.				
A. Säure	braungelb (Harz)	ca. 0,06	unbitter	—
B. Phenol	dunkelbraun (Harz)	ca. 0,08	schwach bitter	aromatisch
C. Bitterstoff	hellgelb (Honig)	ca. 0,06	s. stark bitter	geruchlos

Aus dieser Tabelle lässt sich feststellen, dass in allen drei Eluaten der von Säure und Phenol befreite Bitterstoff der Träger des bitteren Geschmackes ist. Anderseits stimmen Aussehen, Konsistenz, Geruch und Geschmack der verschiedenen getrennten Bestandteile so überein, dass die Vermutung naheliegt, die Säuren, die Phenole und die Bitterstoffe seien einander gleichzustellen, was ausdrücken würde, dass die drei Schichten aus den gleichen Komponenten bestehen, wenn auch in verschiedenen Mengenverhältnissen.

Die chromatographische Analyse konnte hier zur Beweisführung beigezogen werden, und es zeigte sich wirklich, dass die Chromatogramme der einzelnen Bestandteile übereinstimmten.

Um grössere Mengen der einzelnen Bestandteile zu erhalten, wurden dann die oben angeführten Ausschüttelungen mit je 10 g der Schichten 4 und 2, und mit 5 g der Schicht 3 durchgeführt. Der Versuch, die einzelnen auf diese Art gewonnenen Bestandteile in kristallinische Form zu bringen, erwiesen sich als ergebnislos. Weder durch Behandlung mit verschiedenen Lösungsmitteln, noch durch Anwendung verschiedener Temperaturen konnte ein Auskristallisieren erzielt werden. Da die Produkte A und B keinen bitteren Charakter aufwiesen und daher als Verunreinigungen des Bitterstoffes anzusehen waren, wurde von einer weiteren Untersuchung abgesehen und unser Interesse nur dem Bitterstoff C zugewandt.

Ein nochmaliger Versuch einer Hochvakuumdestillation des durch Ausschütteln gereinigten Bitterstoffes führte wieder zu nichts, da auch jetzt bei Temperaturen über 100° C. die Substanz sich zersetzte.

Nachdem es auch auf diese Weise nicht gelang, ein noch reineres Produkt zu erhalten, schritt man zur Verseifung, um wenn möglich aus den Verseifungsprodukten einen Rückschluss auf die Zusammensetzung des Bitterstoffes ziehen zu können.

II. Verseifung der bitteren Anteile.

Es wurden jeweils ca. 0,2 g der verschiedenen Bitterstoffe mit 10 ccm 0,5 n alkoholischer Kalilauge während 30 Minuten am Rückflusskühler erhitzt, erkalten gelassen und mit 0,1 n Salzsäure und Thymolblau zurücktitriert. Dabei konnte festgestellt werden, dass

die in den drei Fällen verbrauchte Kalilauge sich in ziemlich gleichen Grenzen bewegte.

Auf 1 g berechnet erhielt man folgende Werte:

C 4	1 g	Substanz verbraucht	19,4	ccm	0,1 n Kalilauge
C 3	1 g	Substanz verbraucht	20,05	ccm	0,1 n Kalilauge
C 2	1 g	Substanz verbraucht	19,9	ccm	0,1 n Kalilauge

Diese Resultate bestärkten unsere Meinung, dass alle drei Bitterstoffe identisch seien, denn neben Geruch, Geschmack und Aussehen stimmen auch die Verseifungskonstanten überein.

Der nächste Schritt in unseren Untersuchungen bestand darin, die durch Verseifung entstandenen Spaltungsprodukte der verschiedenen Bitterstoffe C zu isolieren und zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden je 2 g der Bitterstoffe mit ca. 0,5 n alkoholischer KOH am Rückflusskühler erhitzt. Die anfänglich hellgelben Lösungen wurden bald dunkelbraun bis schwarz. Nach 30 Minuten Erhitzen wurde auf dem Wasserbad der Alkohol abgedampft und die Lösung im Scheidetrichter mit Aether so oft ausgeschüttelt, bis letzterer nichts mehr aus der wässerigen Lösung auszuziehen vermochte. Die ätherischen Auszüge wurden zusammengebracht: sie enthalten den durch die Verseifung freigewordenen, ätherlöslichen *Alkohol* = *I*. Die zurückbleibende alkalische wässerige Lösung, die noch sehr stark braun aussah, wurde dann mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und mit Aether ausgeschüttelt, bis letzterer keine Bestandteile mehr auszuziehen vermochte. Diese ätherischen Auszüge enthalten den *Säureanteil* = *III*. Die zurückbleibende wässerige Lösung war noch schwach gelb = II.

Die ätherische Lösung III, die die phenolischen oder sauren Anteile der Verseifung enthalten musste, wurde dann mit 5 %iger Natriumkarbonatlösung so lange ausgeschüttelt, bis letztere aus der ätherischen Lösung nichts mehr aufzunehmen vermochte. Dabei stellte sich heraus, dass die Karbonatlösung die ätherische Lösung an Bestandteilen erschöpfte. Diese alkalische Lösung wurde mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und mit Aether wieder ausgeschüttelt.

Derart erhielt man durch die Verseifung:

I. Eine ätherische Lösung, die offenbar den alkoholischen Bestandteil eines Esters enthalten musste.

II. Eine wässerige Lösung, die weder einen in Aether löslichen Alkohol, noch eine Säure oder ein Phenol enthalten konnte.

III. Eine ätherische Lösung, die die sauren ätherlöslichen Bestandteile des Esters enthielt.

Die ätherischen Lösungen I und III wurden mit Wasser jeweils so lange gewaschen, bis sie nicht mehr alkalisch (I), bzw. sauer (III) reagierten, mit Natriumsulfat sicc. getrocknet, filtriert und bei normaler Temperatur der Aether verdunsten gelassen. Man erhielt als Rückstände:

I. Eine gelbe, honigartige, flüssige Masse, deren Geschmack schwach bitter, leicht kratzend, aber vollständig verschieden von der Bitterkeit des Bitterstoffes war.

III. Einen braunen, honigartigen, harzigen Stoff, der geschmacklos war, aber einen eigentümlichen, aromatischen Geruch aufwies, der stark an ranzige Butter oder Fettsäuren erinnerte. Nach längerem Stehenlassen entstanden langsam kristallinische Gebilde, die die ganze Masse durchzogen.

Die wässerige Lösung II wurde eingedampft und es schied sich neben den durch Neutralisieren der alkalischen Lösung (Kalium enthaltend) mittelst Schwefelsäure entstandenen Salzen (Kaliumsulfat) ein brauner geringer Niederschlag aus.

Eine Lösung dieses Niederschlages reduzierte Fehlingsche Lösung sehr schwach, doch gab sie keine positive Kohlenhydratreaktion. Es war nicht möglich, darin irgend ein Verseifungsprodukt nachzuweisen.

Es zeigte sich auch bei diesen Verseifungsversuchen, dass alle drei Bitterstoffe 4, 3 und 2 die gleich aussehenden Spaltprodukte liefern, woraus erneut der Schluss zu ziehen ist, dass die gereinigten Bitterstoffe 4, 3 und 2 einander gleich oder auf alle Fälle sehr ähnliche Stoffe sein müssen.

Infolge der geringen angewandten Mengen der Bitterstoffe erhielt man so geringe Mengen der Spaltprodukte, dass von einer weiteren Untersuchung letzterer abgesehen werden musste. Da wir, wie erwähnt, glaubten annehmen zu dürfen, die Bitterstoffe C 4, C 3 und C 2 seien identisch, haben wir den uns noch verbliebenen Rest vereinigt und verseift.

Bei der Verseifung in der Hitze hatten wir feststellen müssen, dass die Farbe des Verseifungsgemisches sich nach und nach dunkler

färbte, und auch die braunschwarze Farbe der Säureanteile der Verseifung liessen die Vermutung aufkommen, dass eine mögliche Zersetzung eingetreten sein könne. Deshalb wurde versucht, den Bitterstoff in der Kälte zu spalten.

Zu diesem Zwecke wurden ca. 2 g Bitterstoff 4 Tage lang unter öfterem Schütteln mit 20 ccm 0,5 n KOH verseift. Eine Probe wurde nun titriert, während eine zweite Probe noch 30 Minuten in der Wärme am Rückflusskühler erhitzt und nachher auch titriert wurde. Der Vergleich der beiden Verseifungszahlen ergab eindeutig, dass durch die kalte Verseifung der Bitterstoff nicht vollständig zerlegt worden war. So musste von einer kalten Verseifung des Bitterstoffes abgesehen werden.

Die Mengenverhältnisse der Verseifungsprodukte wurden durch Bearbeiten von 2 g Bitterstoff bestimmt.

Man erhielt aus 2 g:

I. Alkohol ..... 1,05 g
II. Säure ..... 0,80 g

Da uns sowieso nur noch ganz geringe Mengen Bitterstoff zur Verfügung standen, verarbeitete man weitere 6 kg Droge, wobei versucht wurde, die bisherige Arbeitsmethode zu verbessern.

III. Verbesserte Darstellung des Bitterstoffes.

1. Extraktion der Droge. Sie erfolgte wie bisher im Grossoxhlet-Apparat. Es wurden 6 kg von Acorus Calamus mundata III mit Petroläther (Fraktion bis 55° C.) extrahiert, unter fortwährendem Entfernen der Extrakte, damit nicht eine allzu lange Temperatureinwirkung zersetzend wirken könnte. Nach siebentägiger Extraktion war die Droge sowohl von bitteren Bestandteilen als auch von einem Gehalt an ätherischem Oel frei. Der im Vakuum vom Petroläther befreite Extraktrückstand betrug 250,0 g.

2. Trennung vom ätherischen Oel. Die 250,0 g Grundextrakt wurden mit 5 Liter Petroläther verdünnt, wobei bei grösserer Verdünnung der früher schon erwähnte harzartige Körper *Harz I* ausfiel. Zur chromatographischen Trennung wurde eine Röhre von 850 mm/65 mm, die mit 2,5 kg Aluminiumoxyd beschickt war, verwendet. Besondere Sorgfalt wurde bei der Füllung der Röhre

angewandt, um eine homogene und luftfreie Adsorptionssäule zu erhalten.

Die vom *Harz I* abfiltrierte Lösung wurde nun langsam durch die Röhre gesaugt und dann die Säule mit ca. 10 Liter Petroläther entwickelt. Dadurch wurde die Herausentwicklung der ganzen Menge ätherischen Oeles und die Festhaltung der bitteren Bestandteile erstrebt. Unter der Quarzlampe beleuchtet, schien die Röhre nicht ein einheitliches System darzustellen; doch wäre es sehr schwer gefallen, die einzelnen Zonen zu trennen, da die Verschiedenheit in den Fluoreszenzen sehr gering war, und so ein scharfes Zerschneiden der Säule unmöglich wurde. Dies wäre auch nicht der Zweck gewesen dieser ersten Adsorption, handelte es sich doch bloss darum, die bitteren Bestandteile vollständig vom ätherischen Oel zu trennen.

So wurden von der Adsorptionssäule nur die oberen, leicht braunen Schichten entfernt, die bloss unbittere Verunreinigungen enthielten. Der Rest der Säule wurde dann so lange mit dem Alkohol-Aether-Gemisch (siehe Seite 25) eluiert, bis letzteres keine bitteren Bestandteile mehr aus dem Aluminiumoxyd herauszulösen vermochte. Die gelbgrüne Elutionsflüssigkeit wurde im Vakuum bei möglichst tiefer Temperatur eingeengt, mit Aether aufgenommen und dieser bei normaler Temperatur in einer Kristallisationsschale abgedunstet.

Das so gewonnene Gemisch stellte eine honigartige, braune Masse dar, von sehr stark bitterem Geschmack. Es war geruchlos und sehr reichlich mit Kristallen durchsetzt, die, wie auf Seite 58 beschrieben, aus einem Sterin bestehen.

3. Trennung vom Sterin. Diese Zähflüssige Masse wurde mit wenig eiskaltem Alkohol verdünnt und abgenutscht, wodurch die Hauptmenge des Phytosterins abgetrennt werden konnte. Obschon die bittere Masse äusserlich keine Kristalle mehr aufwies, so bewies doch das positive Ausfallen der Sterinreaktionen, dass immer noch gewisse Mengen des Phytosterins im Bitterstoffgemisch sich befanden.

Um das Phytosterin vollständig zu trennen, wurde die Extraktionsmasse in 200 ccm 95 % Alkohol gelöst und mit einer warmen 1 %-Digitoninlösung in Alkohol (ca. 150 ccm) versetzt, bis bei weiterem Zusatz kein Niederschlag mehr entstand. Die so behandelte Lösung wurde dann im Eisschrank bei einer Temperatur von 1° C. stehen gelassen und kalt filtriert. Durch die Fällung mittelst Digi-

tonin befand sich ein kleiner Ueberschuss an letzterem in der Lösung, doch da das Digitonin in kaltem Alkohol unlöslich ist, fiel dieses mit der Glykosid-Sterinverbindung aus und konnte so durch Abfiltrieren getrennt werden.

Das alkoholische Filtrat wurde dann im Vakuum eingedampft, mit eiskaltem Aether aufgenommen und von der sehr geringen Trübung, die beim Auflösen entstand, abfiltriert. Diese schwache Trübung rührt davon her, dass die Sterin-Glykosidverbindung in Alkohol zu kleinen Teilen doch löslich, in Aether aber praktisch unlöslich ist.

4. Trennung von den Harzsäuren und Harzphenolen. Die ätherische Lösung des bitteren Extraktes wurde zwecks Abtrennung der Harzsäuren und Harzphenole so lange mit je 20 ccm 1 %iger Natronlauge ausgeschüttelt, bis durch das Alkali keine Bestandteile mehr aus der ätherischen Lösung aufgenommen wurden. Die zurückbleibende gelb gefärbte ätherische Lösung wurde sodann mit Wasser so lange gewaschen, bis die alkalische Reaktion verschwunden war, dann mit Natriumsulfat sicc. getrocknet, filtriert und der Aether bei normaler Temperatur zum Abdunsten gebracht. Das so dargestellte Extrakt, das wir als Rohbitterstoff bezeichnen wollen, stellte eine honigartige, hellbraune, sehr stark bitter schmeckende Masse dar. Sein Gewicht betrug 51,0 *g*.

Der Rohbitterstoff wurde nun neuerdings chromatographiert. Dazu wurde eine Röhre von 800/45 mm benützt, gefüllt mit ca. 1,5 kg Aluminiumoxyd. Die Lösung des Rohbitterstoffes in Petroläther zeigte beim Verdünnen mit dem gleichen Lösungsmittel nur eine sehr geringe Trübung, die leicht abfiltriert werden konnte und die sich als identisch mit dem schon öfters begegneten *Harz I* erwies.

Die Adsorption erfolgte sehr langsam. Nach deren Beendigung wurde die Säule mit Petroläther sehr ausgiebig entwickelt. Dabei konnte festgestellt werden, dass geringe Mengen von ätherischem Oel auch diesmal noch aus der Säule herausentwickelt wurden, was darauf schliessen lässt, dass bei der ersten Trennung Spuren von ätherischem Oel doch adsorbiert blieben.

Das Bild der Säule unter der Quarzlampe zeigte, obschon auch hier nicht der Anspruch auf Einheitlichkeit erhoben werden durfte, keine so stark differenzierte Zonen, dass eine eindeutige Trennung möglich gewesen wäre. Wohl konnte die obere braune

Schicht gut herausgeschnitten werden, doch die anderen Fluoreszenzen waren so wenig verschieden, dass von einem Zerschneiden abgesehen werden musste. So wurde dann die ganze Säule mit dem Alkohol-Aether-Gemisch (siehe Seite 25) eluiert, bis keine bittern Bestandteile mehr aus dem Aluminiumoxyd herausgelöst werden konnten. Die so eluierte Lösung wurde dann im Vakuum eingedampft, der Rückstand mit Aether aufgenommen und in einer Kristallisationsschale vom Aether durch Abdunsten befreit. Man erhielt so 39,0 g Bitterstoff, also 12,0 g weniger als der angewandte Rohbitterstoff. Dieser Verlust ist so zu erklären, dass der zu chromatographierende Rohbitterstoff immer noch gewisse Mengen Fett enthielt, welches dann vom Aluminiumoxyd stark adsorbiert wurde und so als Verlust erscheint. Dies wurde dadurch bewiesen, dass durch Behandeln des Aluminiumoxyds mit NaOH und nachfolgendem Ausschütteln mit Aether ca. 10,5 g des *Fettes I* gewonnen werden konnten. Offen blieb noch die Frage, ob von diesem Fett noch im Bitterstoff vorhanden sei, denn nachdem bei der ersten und auch bei der zweiten Chromatographie noch Fett adsorbiert wurde, musste vermutet werden, dass ein Teil des bei der Chromatographie adsorbierten Fettes durch die starke Elution wieder herausgelöst wurde.

Um dieser Frage nachzugehen, stellten wir einige chromatographische Versuche im Kleinen dar. Dabei zeigte es sich, dass mit kleinen Mengen gearbeitet, viel stärker entwickelt werden konnte, als mit grossen Mengen, was zur Folge hatte, dass man in einer kleinen Säule ein eindeutigeres Chromatogramm erhalten konnte. Es zeigte sich, dass vier Fünftel der Säule durchwegs in allen Versuchen einheitlich aussahen und dass nur das letzte Fünftel verschiedene kleine Zonen aufwies, die man als Verunreinigungen annehmen konnte. Auch zeigte es sich, dass weder diese Verunreinigungen, noch der bittere Hauptanteil Fett enthielten; auch konnte durch Behandeln des Aluminiumoxydes mit NaOH diesmal kein *Fett I* nachgewiesen werden. Damit war erwiesen, dass durch die zwei ersten Adsorptionen alles *Fett I* entfernt worden war.

Da es aber praktisch unmöglich erschien, im Grossen solch gut differenzierte Chromatogramme zu erhalten wie im Kleinversuch, und da letztere Versuche gezeigt hatten, dass die Verunreinigungen nur in geringem Masse vorhanden waren, entschlossen wir uns, von einer weiteren Reinigung des Bitterstoffes mittelst der chromatographischen Analyse abzusehen und unsere nächste Aufgabe darin zu

sehen, die verschiedenen Verseifungsprodukte des Bitterstoffes gründlichst zu untersuchen.

5. Reaktionen des gereinigten Bitterstoffes.

A. *Aussehen.* Der Bitterstoff stellte eine honigartige, gelbbraune Flüssigkeit dar, die sehr stark bitter schmeckte und keinen aromatischen Geruch aufwies.

B. *Löslichkeitsverhältnisse.* Der Bitterstoff war löslich in allen organischen Lösungsmitteln, dagegen unlöslich in Wasser und in verdünntem Alkohol.

C. *Stickstoffgehalt.* Die Prüfung auf Stickstoff nach *Lassaigne*[26]) und *Dumas*[27]) zeigte kein positives Resultat.

6. Verseifung des gereinigten Bitterstoffes. Da eine Verseifung ohne Wärmeanwendung, wie es die Vorversuche gezeigt haben, zu keiner vollständigen Spaltung des Bitterstoffes führte, mussten wir sie trotz der Bedenken einer eventuell eintretenden Zersetzung doch mit Wärme vornehmen. Es wurden dabei aber nicht Temperaturen über 75° C. angewandt.

Die Durchführung der Verseifung erfolgte nach folgender Methode:

Ca. 25,0 g des gereinigten Bitterstoffes wurden mit 100 ccm 0,5 n. alkoholischer Kalilauge versetzt und 30 Minuten im Wasserbad am Rückflusskühler erhitzt. Dabei wurde die Temperatur so reguliert, dass die alkalische Flüssigkeit nicht über 75° C. erhitzt wurde. Nach dem Erkalten wurde die nun dunkelbraun gefärbte Flüssigkeit im Vakuum vom Alkohol befreit und dann mit ca. 100 ccm Wasser verdünnt. Die wässerige alkalische Lösung wurde dann so lange mit je 20 ccm Aether ausgeschüttelt, bis der Aether keine Bestandteile mehr herauszulösen vermochte; darauf wurden die ätherischen Ausschüttelungen zusammengebracht = I.

Die immer noch stark braune, aber jetzt klare wässerige alkalische Lösung wurde mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert. Dabei fiel ein voluminöser Niederschlag aus. Diese nun trübe saure Lösung wurde so lange mit kleinen Mengen Aether ausgeschüttelt, als dieser aus der wässerigen Lösung noch Stoffe herauslöste und die ätherischen Auszüge zusammengebracht = II.

Die zurückbleibende wässerige Lösung sah nach diesen Ausschüttelungen farblos bis hellgelb aus. Sie reduzierte Fehlingsche Lösung nur sehr schwach, gab aber keine positive Kohlenhydrat-

reaktion. Zur Trockene eingedampft, hinterblieb neben dem Kaliumsulfat ein sehr geringer harziger Rückstand, welcher hart und unbitter war. Eine Prüfung auf Glyzerin fiel negativ aus. Daraus ist zu ersehen, dass die wässerige Lösung nur geringe, bei der Verseifung entstandene Zersetzungsprodukte enthielt, welche von keiner Bedeutung sind.

Alkoholischer Anteil I. Die ätherische Lösung I wurde so lange mit Wasser gewaschen, bis keine alkalische Reaktion mehr nachgewiesen werden konnte, dann mit Natriumsulfat sicc. getrocknet, von diesem abfiltriert und der Aether verdunsten gelassen.

Säureanteil II. Die ätherische Lösung II wurde so oft mit 5 %iger Natriumkarbonat-Lösung ausgeschüttelt, als diese daraus Substanz aufnahm. Die vereinigten alkalischen Auszüge wurden dann mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und diese schwach saure, trübe Flüssigkeit mit Aether erschöpft. Diese ätherische Lösung, die stark gelb gefärbt war, enthielt die Säuren. Die zurückbleibende wässerige Lösung war farblos und klar, sie enthielt keine Bestandteile des Bitterstoffes mehr. Die säurehaltigen, ätherischen Ausschüttelungen wurden mit Wasser gewaschen, getrocknet, abfiltriert und vom Aether durch Verdunstung befreit.

Ausbeuten aus 25,0 g Bitterstoff.

I. Alkohol ..... 13,2 g
II. Säure ..... 10,5 g

I. ALKOHOL. TEIL.

a) Eigenschaften. Er stellt eine honigartige gelbgrüne Flüssigkeit dar, deren Geschmack eigentümlich brennend-bitter ist und einen schwach aromatischen Geruch (nicht an Kalmus erinnernd) aufweist. Er reduziert Fehlingsche Lösung nicht. In organischen Lösungsmitteln ist er gut löslich, dagegen vollständig unlöslich in Wasser. Eine Bildung von Kristallen konnte darin nicht erreicht werden.

b) Chromatographie. Der alkoholische Bestandteil wurde nun auf Einheitlichkeit an Hand der Chromatographie geprüft. Dabei zeigte sich, dass er nicht als einheitlicher Körper betrachtet werden kann. Das Chromatogramm zeigte deutlich das Vorhandensein von verschiedenen Zonen. Es sind also entweder verschiedene Alkohole

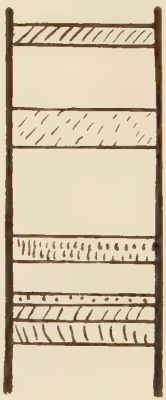
vorhanden, oder es handelt sich um einen einzigen Alkohol, der von mehreren Verunreinigungen begleitet ist. Um dieser Frage näherzutreten, wurde versucht, den alkoholischen Anteil im Hochvakuum zu destillieren, um auf diesem Weg einen reinen Körper zu erhalten.

c) Vakuumdestillation. Bei einem Druck von *0,04 mm Hg* wurden 5 g des Alkoholgemisches im Bleibad langsam erwärmt. Dabei konnte festgestellt werden, dass bei einer Temperatur von 110—125° C. etwa 5 % des Alkohols als zähe Masse destillierte. Nur die ersten Tropfen waren hellgelb, bei weiterer Destillation sah das Destillat rot bis braun aus. Auch der Rückstand im Destillierkolben wurde allmählich braun-schwarz. Daraus war ersichtlich, dass bei dieser Destillation eine Zersetzung stattfinden musste. Diese Vermutung wurde auch noch verstärkt durch das chromatographische Bild des gewonnenen klaren Destillates, welches im Vergleich zum chromatographischen Bild des Alkohols vor der Destillation noch viel weniger einheitlichen Charakter zeigte.

Chromatogramme des alkoholischen Anteiles.

A Vor der Vak. Destillation

B Nach der Vak. Destillation



Aus diesem Vergleich der Chromatogramme ist ersichtlich, dass der alkoholische Anteil durch die Hochvakuumdestillation in hohem Masse zersetzt wurde.

d) Esterbildung.

1. Azetylieren mit Essigsäureanhydrid und Natriumazetat.

2. Azetylieren mit Azetylchlorid und Pyridin nach *Einhorn*[28]).

1. Ca. 1,0 g des alkoholischen Teiles wurde in einem Azetylierungskölbchen mit 3 g Essigsäureanhydrid und 1 g geschmolzenem Natriumazetat am Rückflusskühler während 30 Minuten in gleichmässigem Sieden erhalten. Dann wurde dieses Gemisch mit 10 ccm Wasser verdünnt und auf dem Wasserbad erhitzt. Nach dem Erkalten war das azetylierte Gemisch trübe und es setzte sich bald ein braunschwarzer Körper nieder, der nach Abgiessen des Wassers mit Aether aufgenommen wurde. Nach Abdunsten des Aethers blieb eine braune honigartige Masse zurück. Dieser Körper zeigte keine kristallinische Struktur, chromatographiert war sein Bild uneinheitlich. Wir versuchten den Alkohol noch zweimal zu azetylieren, indem wir einmal mehr Essigsäureanhydrid verwendeten, das andere Mal direkt, ohne die azetylierten Produkte vorher noch zu erwärmen, sie mit Aether ausschüttelten. Doch die gewonnenen Produkte waren immer die gleichen, mit dem bei der ersten Azetylierung erhaltenen Körper identisch.

Da dieser Körper bei der Verseifung keine Verseifungszahl gab, war dadurch bewiesen, dass keine Veresterung stattgefunden hatte.

2. Ca, 0,5 g des alkoholischen Teiles wurden in 5 ccm Pyridin, das vorher gereinigt wurde, gelöst. Die Pyridinmischung wurde in Eis gestellt, und dazu sehr langsam 2 ccm Azetylchlorid getröpfelt. Diese Mischung wurde 24 Stunden bei 0° C. stehen gelassen, dann langsam auf Zimmertemperatur gebracht. Diese Lösung wurde dann mit 100 ccm Aether verdünnt und diese ätherische Lösung mehrmals mit 0,5 n Schwefelsäure ausgeschüttelt, bis dadurch alles Pyridin gebunden und entfernt worden war. Dem Aether hatten wir ca. 20 ccm Chloroform zufügen müssen, da bei der Entfernung des Pyridins der Aether nicht alle in der ursprünglichen Aether-Pyridin-Lösung gelösten Stoffe in Lösung erhalten konnte. Diese Chloroform-Aetherlösung wurde dann zur Trockene gebracht. Der Rückstand enthielt eine kleine Menge eines Produktes, das in Aether unlöslich war, dagegen gut löslich in Chloroform. Der ätherlösliche Anteil war identisch mit dem unveränderten alkoholischen Teil, während der unlösliche Körper ganz andere Konsistenz aufwies. Er stellte eine hellgelbe, harte und brüchige Masse dar, die keinen bitteren

Geschmack aufwies. Andere Azetylierungen mittels Pyridin und Azetylchlorid lieferten alle kleine Mengen dieses Produktes. Durch Aenderung der Azetylierverhältnisse (Temperatur, Azetylierungszeit) konnte nur bewirkt werden, dass die Ausbeute in geringem Masse vergrössert wurde.

Dieser harte, brüchige, hellgelbe Körper, der in Alkohol sehr gut löslich ist, konnte nicht in kristallinische Form gebracht werden. Daher wurde versucht, seine Einheitlichkeit durch Chromatographie zu prüfen. Das Chromatogramm zeigte verschiedene fast gleich grosse Zonen, was zur Genüge bewies, dass wir es hier nicht mit einem einheitlichen Körper zu tun hatten.

Aus diesen Versuchen wurde ersichtlich, dass der alkoholische Bestandteil des Bitterstoffes nicht rein erhalten werden konnte; so sahen wir auch von einer Elementaranalyse ab. Festgestellt werden kann nur, dass der alkoholische Bestandteil des Bitterstoffes, der durch Verseifung gewonnen wurde, eine nicht einheitliche, honigartige, gelbe Masse darstellt. Wir haben auch dadurch entgegen *Thoms* nachweisen können, dass bei der Spaltung des Bitterstoffes kein ätherisches Oel entsteht, sondern ein zähflüssiger Alkohol.

II. SÄUREANTEIL.

a) Eigenschaften. Dieser Anteil stellte einen dunkelbraunen, harzigen Körper dar, dessen Geschmack kratzend und nicht bitter war. Der Geruch war eigentümlich aromatisch, an den Geruch von ranziger Butter erinnernd. Die ganze Masse war reichlich mit Kristallen durchsetzt, welche in sternförmigen Büscheln gruppiert waren.

b) Löslichkeitsverhältnisse. Die braune Masse, die gegen Lackmus schwach sauer reagierte, war löslich in Aether, Alkohol und organischen Lösungsmitteln, mit Ausnahme von Petroläther, in welchem nur ein Teil des Säuregemisches löslich war. In Wasser und stark verdünntem Alkohol ist sie gänzlich unlöslich.

Es zeigte sich, dass der in Petroläther unlösliche Teil den kristallinischen Teil der Säuren darstellt. So wurde nun das ganze Säuregemisch mit Petroläther behandelt und wir bekamen:

A. Petroläther, löslicher Teil..... ca. 43 %
B. Petroläther, unlöslicher Teil .. ca. 57 %

A Petroläther löslicher Teil.

Vom Petroläther befreit, sah das extrahierte Produkt jetzt ölig aus; es wies eine hellgelbe Farbe auf. Nach kurzem Stehenlassen schieden sich Kristalle aus, die unter dem Mikroskop betrachtet büschelförmig zusammengesetzt waren und die ganze Masse regelmässig durchsetzten. Die Beschaffenheit dieses Extraktes gab den Eindruck, als ob es sich um eine ölige Flüssigkeit mit kristallinischen Einlagerungen handeln würde. Dadurch war die Vermutung naheliegend, es könne sich hier um ein Gemisch von festen und flüssigen Säuren, und zwar wahrscheinlich Fettsäuren, handeln.

Trennung der festen von den flüssigen Fettsäuren.

Zu diesem Zweck sind schon verschiedene Methoden ausgearbeitet worden. Sie beruhen vorwiegend auf dem verschiedenen Verhalten der Bleisalze von Fettsäuren gegenüber verschiedenen Lösungsmitteln.

Es wurde von uns die nachstehend beschriebene, von den „Astra"-Werken in Steffisburg ausprobierte neue Bleisalzalkoholmethode angewandt, die es ermöglicht, die Fettsäuren in ihre festen und flüssigen Anteile zu trennen. Sie hat gegenüber der Methode von *Twitchell*[29]) den Vorteil einer besseren Ausbeute und einer schärferen Trennung in feste und flüssige Anteile.

Ausführung. Ca. 4 g des Fettsäurengemisches A wurden in 45 ccm 92—93%igem Alkohol gelöst. Dazu gab man dieselbe Menge einer 4,5 g Bleiazetat enthaltenden alkoholischen Lösung. Die Bleiazetatlösung wurde siedend der siedenden Fettsäurelösung zugesetzt, das Gemisch zum Kochpunkt erhitzt, langsam auf 15—20° C abgekühlt und bei dieser Temperatur über Nacht stehen gelassen. Darauf filtrierte man den entstandenen grau-braunen Niederschlag auf einem Büchnertrichter ab und wusch mit 100 ccm Petroläther von 40—60° C. in Portionen von 20 ccm den Niederschlag aus. Das Filtrat enthielt die Bleisalze der flüssigen Säuren. Den Niederschlag spülte man mit 100 ccm Alkohol in das Becherglas zurück, versetzte mit 0,5 ccm Eisessig, erhitzte zum Sieden, liess dann auf 15° C. abkühlen, filtrierte die entstandenen umkristallisierten Bleiseifen und wusch sie mit 92—93 %-Alkohol aus. Der so gereinigte Niederschlag wurde wiederum in das Becherglas gebracht und das Filter mit Aether in dasselbe abgespült. Die Bleisalze wurden mit ver-

dünnter Salpetersäure gespalten, die Schichten im Scheidetrichter getrennt und die ätherische Fettsäurelösung mit Wasser gewaschen bis dieses gegen Methylorange neutral reagierte. Den Aether destillierte man ab, und es blieben die festen Säuren zurück.

Das alkoholische-petrolätherische erste Filtrat, das die Bleisalze der flüssigen Säuren enthält, wurde zur Trockene gebracht, die Bleisalze mit Aether aufgenommen und dann mit verdünnter Salpetersäure gespalten. Die ätherische Fettsäurelösung wurde getrennt und der Aether verdunsten gelassen.

Durch die in dieser Weise durchgeführte Trennung bekamen wir also:

a) Feste Säuren ..... 2,1 g
b) Flüssige Säuren ..... 1,8 g

a) Feste Säuren.

Diese festen Säuren, die immer noch grau-weiss aussahen, wurden zuerst auf ihren Sättigungszustand geprüft. So wurde mit einer kleinen Menge der festen Säuren die Jodzahl bestimmt und anderseits auch die Permanganatprobe ausgeführt. Beide Versuche ergaben negative Resultate, was bewies, dass das hier vorliegende feste Säuregemisch als gesättigt zu betrachten ist.

Eine Reinigung der Säuren wurde durch wiederholtes Umkristallisieren zu erreichen gesucht. Die Substanz wurde in Alkohol gelöst, die Lösung erwärmt und dann mit soviel warmem Wasser verdünnt, dass die Säure gerade noch in der Wärme löslich war, während sich die braunen Verunreinigungen bereits ausschieden. Nach dem Filtrieren durch einen Warmwassertrichter wurde das noch klare Filtrat in die Kälte gestellt, worauf sich bald eine voluminöse weisse Masse ausschied. Diese flockige Masse der Fettsäuren wurde abfiltriert und noch zweimal in gleicher Weise aus warmer verdünnter alkoholischer Lösung umkristallisiert. Es wurde so eine rein weisse Fettsäure erhalten, die anschliessend aus 95 % Alkohol umkristallisiert wurde. Es entstanden langsam weisse nadel- und sternförmige Kristalle, die folgende Merkmale aufwiesen:

Der Schmelzpunkt mit dem Mikroschmelzpunktapparat bestimmt, ergab *61,5—62° C.* Dieses Resultat liess die Vermutung aufkommen, dass es sich um Palmitinsäure handeln könne, besitzt doch

diese denselben Schmelzpunkt. Eine Mischschmelzpunktbestimmung, ausgeführt mit reiner Palmitinsäure und der von uns gefundenen Säure ergab *61,9° C.* Es wurden dann auch noch verschiedene Säurezahlbestimmungen durchgeführt, die folgende Ergebnisse zeitigten:

Säurezahlbestimmung oder Neutralisationszahlbestimmung.

Es wurden zweimal 0,05 g der zu untersuchenden Säure mit 0,1 n KOH titriert.

I gebrauchte 0,1 n KOH .... 1,95 ccm
II gebrauchte 0,1 n KOH .... 1,94 ccm

1 ccm 0,1 n KOH entspricht 0,00561 g KOH.

$$\text{N. Z. I} \quad \frac{1{,}95 \times 5{,}61}{0{,}05} = 218{,}8$$

$$\text{N. Z. II} \quad \frac{1{,}90 \times 5{,}61}{0{,}05} = 217{,}7$$

Die Neutralisationszahl der reinen Palmitinsäure beträgt *218,92.* Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt und Neutralisationszahl zeigen, dass die von uns isolierte feste Fettsäure **Palmitinsäure** *($C_{16}H_{32}O_2$)* ist.

Andere gesättigte Säuren konnten in diesem Anteil nicht nachgewiesen werden.

b) Flüssige Säuren.

Das bei der Trennung von der festen Fettsäure gefundene flüssige Fettsäurengemisch stellte eine öligflüssige, braunrot gefärbte Masse dar.

Es war naheliegend, dass diese flüssigen Säuren ungesättigte Säuren sein mussten; dies bestätigte zuerst die Permanganat-Probe, die eindeutig positiv ausfiel. Der Versuch, eine Jodzahl zu bestimmen, um Aufschluss über den Sättigungsgrad der Säuren

zu bekommen, misslang infolge der Schwierigkeit, ja sogar Unmöglichkeit, den Umschlagspunkt feststellen zu können, da das Gemisch schon an und für sich eine rotbraune Farbe aufwies. Allerdings konnte wenigstens festgestellt werden, dass Jodmonobromid verbraucht wurde, was den ungesättigten Grad des Fettsäuregemisches aufs neue bewies.

a) Bromierung der ungesättigten Fettsäuren.

Die ungesättigte Fettsäurefraktion wurde in 10 ccm Eisessig gelöst und während ca. 3 Stunden in die Kälte gestellt. Dann wurde zur kalten aber nicht erstarrten Eisessiglösung tropfenweise eine abgekühlte 2 % Bromeisessiglösung unter kräftigem Schütteln zugefügt, bis die Fettsäurelösung bei weiterem Schütteln schwach gelbrot blieb. Dieses bromierte Gemisch wurde vier Stunden lang in einem Kältegemisch stehen gelassen und dann mit eiskaltem Wasser stark verdünnt. Es fiel dabei ein hellgelber flockiger Niederschlag aus, der abfiltriert wurde.

Dieser Niederschlag wurde zur Entfernung der Hauptmenge des überschüssigen anhaftenden Broms mit Wasser gewaschen und hierauf zur weiteren Reinigung noch einmal in Eisessig aufgelöst und die kalte Lösung dann mit Wasser stark verdünnt, worauf er neuerdings ausfiel, diesmal aber schon viel heller gefärbt.

Die bromierten Fettsäuren zeigen ein verschiedenes Verhalten gegenüber Lösungsmitteln, was teils zu ihrer Identifizierung dienen kann.

Das von uns bromierte und vorgereinigte Produkt zeigte sich in allen organischen Lösungsmitteln sehr leicht löslich, mit Ausnahme von Petroläther, in welchem es sogar in der Wärme nur in grosser Verdünnung löslich war. Dieses Verhalten, das nur den bromierten Verbindungen der α-Linolsäure und der Elaeostearinsäure eigen ist, gab uns schon einen Anhaltspunkt.

Die bromierte Fettsäurefraktion wurde in warmem Petroläther gelöst und erkalten gelassen, worauf sich langsam eine weisse kristallinische Fällung bemerkbar machte, während der Petroläther seine gelbe Farbe, die von den gelösten Verunreinigungen herrührt, beibehielt. Nach Abfiltrieren des Niederschlages wurde dieses Umkristallisieren noch zweimal wiederholt, bis die Substanz rein weiss war. Dabei zeigte es sich, dass sie mit fortschreitender Reinheit in Petroläther immer schwerer löslich wurde.

b) Schmelzpunktbestimmung.

Im Mikroschmelzpunktapparat bestimmt, ergab sich ein Schmelzpunkt der bromierten Fettsäure von *113,5—114° C.* Dieser Schmelzpunkt stimmt mit dem des bromierten Produktes von α-Linolsäure überein. Zur Kontrolle wurde ein Mischschmelzpunkt bestimmt.

Wir stellten zuerst durch Verseifung aus Leinöl eine reine α-Linolsäure dar, die genau gleich bromiert wurde wie die von uns isolierte ungesättigte Fettsäure. Nach mehrmaligem Reinigen und Umkristallisieren wurde der Schmelzpunkt bestimmt, der *113,5° C.* aufwies. Der Mischschmelzpunkt betrug *113—114° C.*, was wahrscheinlich machte, dass die von uns gefundene ungesättigte Säure *α-Linolsäure* und deren bromiertes Produkt *Tetrabromstearinsäure* ist.

c) Brombestimmung.

Mit dem Rest der bromierten Säure wurden zur Bestätigung noch Brombestimmungen durchgeführt. Es wurde die von *Kekule*[30]) für bromierte Fettsäuren vorgeschlagene Methode angewandt. Sie beruht auf der Einwirkung von naszierendem Wasserstoff auf die bromierte Säure in alkalischer Lösung, wodurch das Halogen substituiert und als Alkalisalz gebunden wird. Es wird dann argentometrisch bestimmt.

1. Ausführung.

Ca. 0,2 g der zu untersuchenden bromierten Fettsäure wurden in 20 ccm Wasser aufgeschwemmt und während ca. 24 Stunden mit Natriumamalgam digeriert. Es wurde soviel Natriumamalgam zugegeben, dass immer ein reichlicher Wasserstoffstrom entwickelt wurde. Die alkalische Flüssigkeit wurde dann mit Salpetersäure neutralisiert, dann mittelst 0,1 n Silbernitrat und Kaliumchromat das entstandene Nabr bestimmt.

2. Resultate.

I. Menge Substanz 0,200 g. Verbrauchte 0,1 n $AgNO_3$ = 13,30 ccm
II. Menge Substanz 0,2001 g. Verbrauchte 0,1 n $AgNO_3$ = 13,35 ccm

1 ccm 0,1 n $AgNO_3$ = 0,01092 g Nabr.

I. 13,30 ccm 0,1 n $AgNO_3$ = 0,1369 g Nabr.
II. 13,35 ccm 0,1 n $AgNO_3$ = 0,1374 g Nabr.

1 g Nabr. = 0,7765 g Br.

I. 0,1369 g Nabr. = 0,1064 g Br.
II. 0,1374 g Nabr. = 0,1067 g Br.

3. Bromgehalt: I. 53,2 %
II. 53,32 %

Die Tetrabromstearinsäure hat einen Bromgehalt von 53,33 %. Die gefundene ungesättigte Säure ist also **α-Linolsäure.**

B Petroläther unlöslicher Anteil.

a) Aussehen. Er bildete eine braunschwarze zähflüssige Masse, in welcher nach zweitägigem Stehen im Schwefelsäureexsikator sich Kristalle auszuscheiden begannen, die bald das ganze Produkt durchsetzten. Unter dem Polarisationsmikroskop bildeten die Kristalle plumpe breite Nadeln, die wie kleine Aeste die ganze Masse durchsetzten.

b) Reinigung. Nach zwei Wochen war keine weitere Kristallbildung mehr wahrnehmbar. Durch Behandeln mit Lösungsmitteln konnte keine Trennung der Kristalle von der übrigen braunen Masse erreicht werden. So entschlossen wir uns, durch Chromatographieren die Kristalle zu isolieren oder mindestens stark anzureichern, nachdem ein kleiner Vorversuch die Möglichkeit dieses Verfahrens gezeigt hatte. Das in Petroläther unlösliche Säuregemisch wurde in Essigäther gelöst, auf Aluminiumoxyd adsorbiert und die Säule mit Essigäther stark entwickelt. Das Chromatogramm zeigte eine deutlich abgegrenzte breite Zone und daneben 3—4 kleine verschiedene Schichten. Durch Eluieren mit Aether konnten die Produkte der verschiedenen Schichten gewonnen werden. Es konnte festgestellt werden, dass einzig das Eluat der breiten Zone Kristalle enthielt, während die andern nur die braune zähflüssige Masse enthielten. Indessen war die eluierte Lösung der Kristalle nicht farblos, sondern immer noch durch geringe Mengen des braunen Produktes gefärbt. Zur Trockene gebracht sah die Masse hellbraun aus und war reichlich mit Kristallen durchsetzt.

Diese braune Kristallmasse wurde dann in warmem Benzol gelöst und verschlossen in den Eiskasten gestellt. Langsam bildeten sich wasserklare Kristallnadeln; nach ca. 2 Wochen schien die Kristallbildung zu Ende zu sein. Die Nadeln wurden abfiltriert und mit kaltem Benzol abgewaschen; doch wiesen sie immer noch eine hellgelbe Farbe auf. Sie wurden erneut in warmem Benzol gelöst und in der Kälte auskristallisieren gelassen. Um rein weisse Kristalle zu erhalten, musste das Umkristallisieren aus Benzol noch zweimal wiederholt werden. Dann waren die Kristalle rein weiss und bildeten schöne Nadeln.

c) Schmelzpunktbestimmung.

Sie erfolgte mit dem Mikroschmelzpunktapparat und zeigte folgenden Verlauf. Bei langsamer Steigerung der Temperatur konnte kein Schmelzen beobachtet werden, sondern der feine Kristallstaub fing bei 158° C. an zu verschwinden, ohne zu schmelzen. Dagegen konnte ein Sublimieren festgestellt werden.

Deshalb reinigten wir die Kristalle erstens noch einmal durch Sublimation. Der nun ganz reine Körper wurde dann auf dem Mikroschmelzpunktapparat so rasch erwärmt, dass er seine Schmelztemperatur erreichte, bevor er wegsublimiert war. Es konnte so zuerst festgestellt werden, dass die Kristalle um 177—179° C. schmelzen mussten. Genauere Bestimmungen ergaben einen eindeutigen *Schmelzpunkt von 178° C.* Durch Anwendung der Polarisation konnte der Uebergang zwischen fester und geschmolzener Form besonders leicht und deutlich festgestellt werden.

Wir hatten gesehen, dass dieser Körper, der sauren Charakter hat, in Petroläther unlöslich ist. Die Feststellung liess in uns die Vermutung aufkommen, dass es sich hier um eine *Oxyfettsäure* handeln könne. Sie schmilzt bei *178° C.* und beginnt bei *158° C.* zu sublimieren.

Das wiederholte Umkristallisieren hatte die Menge des zu untersuchenden Körpers so verringert, dass uns nur noch sehr geringe Mengen für eine Analyse zur Verfügung standen. So war es uns leider nur möglich, eine Mikroanalyse durchzuführen.

d) Elementaranalyse:

I. 2,176 mg Substanz gaben	1,776 mg H_2O
	5,281 mg CO_2
Berechnet für $C_{22}H_{36}O_6$	66,66 % C; 9,09 % H
Gefunden	66,19 % C; 9,13 % H.

e) Molekulargewichtsbestimmung nach Rast[31]):

Substanz	0,005 g
Campher	0,057 g
Schmelzpunkt des Camphers	174° C.
Schmelzpunktdepression —	9° C.
Berechnet für $C_{22}H_{36}O_6$	Mol. Gew. 396,28
Gefunden	Mol. Gew. 387,2

Ergebnisse:

Als Verseifungsprodukte des von uns dargestellten Bitterstoffes hatten wir erhalten:

1. Einen nicht kristallinischen, honigartigen alkoholischen, Anteil.
2. Drei Säuren: a) Palmitinsäure;
   b) α-Linolsäure;
   c) eine Oxysäure ($C_{22}H_{36}O_6$).

Schon vor der Verseifung des Bitterstoffes hatten wir vermutet, dass er nicht einheitlich sei, sondern immer noch Verunreinigungen enthalte; deshalb war es wünschenswert, folgende zwei Fragen aufzuklären:

I. Stammen die gefundenen Säuren aus dem Bitterstoff, oder sind sie Spaltprodukte der Verunreinigungen?

II. Ist der durch Verseifung erhaltene alkoholische Anteil einheitlich, oder bildet er ein Gemisch aus verschiedenen Alkoholen nebst Verunreinigungen?

Bei der Darstellung des Bitterstoffes hatten wir versucht, ihn durch die Chromatographie weiter zu reinigen, doch wir hatten einsehen müssen, dass eine weitere Reinigung durch diese Methode wohl mit kleinen Mengen durchführbar war, während ein Arbeiten im Grossen keine eindeutigen Resultate zeigte. Dies veranlasste uns damals, von weiteren chromatographischen Adsorptionen abzusehen und das Bitterstoffgemisch zu verseifen.

Nachdem wir nun wussten, aus welchen Bestandteilen das Bitterstoffgemisch besteht, schien es wünschenswert, geringe Mengen dieses Gemisches durch Chromatographie noch weiter zu zerlegen.

Chromatographie. Ca 2 g des Bitterstoffgemisches wurden in 100 ccm Petroläther und 5 ccm Benzol gelöst; diese Lösung wurde dann in einer Adsorptionsröhre von 500/20 mm an Aluminiumoxyd adsorbiert. Ein kleiner Teil der Aluminiumoxyd-Säule genügte, um die 2 g Bitterstoff zu adsorbieren. Nun konnte reichlich mit dem Petroläther-Benzol-Gemisch (100 ccm Petroläther + 5 ccm Benzol) entwickelt werden. Dieses Entwickeln wurde so lange durchgeführt, bis sich der Bitterstoff auf die ganze Säule verteilt hatte. Mit blossem Auge betrachtet, schien die Säule einheitlich hellgelb gefärbt zu sein, während unter der Quarzlampe verschiedene Fluoreszenzen wahrzunehmen waren, wie folgendes Bild zeigt.

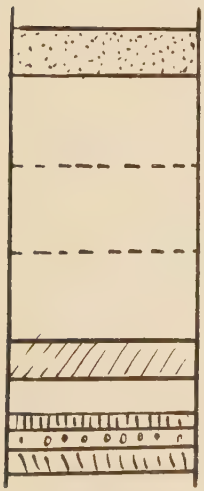


Fig. 4

Zerschneiden der Säule. Wir konnten leicht die Säule in 5 Schichten teilen. Einzig bei der Schicht 2, die sechs Achtel der Säule ausmacht, war in der Mitte eine andere Fluoreszenz als oben und unten festzustellen. Es schien hauptsächlich ein Unterschied in der Intensität des Aufleuchtens vorhanden zu sein. Deshalb zerteilten wir diese Schicht 2 in drei Unterschichten.

Alle getrennten Schichten und Unterschichten wurden mit dem Alkohol-Aether-Gemisch (siehe Seite 25) eluiert und im Vakuum zur Trockene gebracht. Bei der Untersuchung der so gewonnenen Produkte konnte festgestellt werden, dass einzig die Schichten 2a, 2b und 2c bitter waren, während alle vier anderen Produkte keinen bitteren Geschmack aufwiesen.

I. Bittere Schichten. Alle drei Produkte stellten eine gelbe, zähflüssige, geruchlose, aber sehr stark bitter schmeckende Masse dar. Obschon die Schicht 2 in drei gleich grosse Unterschichten zerteilt worden war, so war doch die Ausbeute an Bitterstoff verschieden, indem sie von 2a nach 2c zunahm. Die beobachteten geringen Fluoreszenzunterschiede könnten mit diesem Unterschied an Gehalt zusammenhängen. Auf alle Fälle zeigten kleine Chromatogramme der Produkte 2a, 2b und 2c die genau gleichen Fluoreszenzen; deshalb nahmen wir an, dass die Produkte der Schicht 2 einander gleichzustellen seien.

II. Unbittere Schichten. Alle vier gewonnenen Körper waren nicht bitter, aber von verschiedener Konsistenz, doch konnten keine kristallinischen Produkte erhalten werden. Sie stellten alle eine mehr oder weniger harzige, braune bis schwarzbraune Masse dar.

Wir versuchten noch einmal, die allein für uns wichtige Schicht 2 zu chromatographieren. Es zeigte sich, dass die ganze Säule einheitlich hell-weiss-gelblich aufleuchtete. So konnten wir annehmen, dass der Bitterstoff in genügender Reinheit vorhanden war. Nach Eluieren und Eindampfen im Vakuum blieb eine geringe Menge eines honiggelben, zähflüssigen Körpers zurück, der sehr stark bitter schmeckte und geruchlos war. Die Haltbarkeit dieses gereinigten Bitterstoffes erscheint gering, denn schon nach kurzer Aufbewahrung im Schwefelsäure-Exsikkator (4—5 Tage) färbte er sich dunkler.

Durch Trennung mittelst der Chromatographie hatten wir aus 2 g Bitterstoffgemisch bekommen:

1. Bittere Bestandteile ..... 1,2 g
2. Nicht bittere Bestandteile ..... 0,3 g

Verseifung. Der gereinigte Bitterstoff und die vereinigten nicht bitteren Verunreinigungen wurden nun für sich nach dem gleichen Verfahren verseift wie auf Seite 40 angegeben ist.

I. GEREINIGTER BITTERSTOFF.

1. Alkoholischer Anteil.

a) Aussehen. Er stellt eine zähflüssige, gelbe Masse dar, die sehr wenig bitter ist, dagegen einen aromatischen Geruch aufweist.

b) Löslichkeit. Er ist in allen organischen Lösungsmitteln leicht löslich, mit Ausnahme von Petroläther, in welchem er nur schwer zu lösen ist. In Wasser ist er ganz unlöslich.

c) Chromatographie. Eine Chromatographie, ausgeführt mit einer Petroläther-Essigäther-Lösung (4 Teile Petroläther und 1 Teil Essigäther) auf Aluminiumoxyd zeigte folgende Erscheinung:

Der alkoholische Anteil des Bitterstoffes wurde sehr wenig vom Aluminiumoxyd adsorbiert, deshalb benutzten wir eine sehr lange Adsorptionsröhre.

Nach Adsorption und Entwickeln mit dem oben angegebenen Petroläther-Essigäther-Gemisch konnten unter der Quarzlampe in der Säule drei verschiedene Fluoreszenzen beobachtet werden. Dabei war auffallend, dass die Hauptschicht an Menge ca. $^3/_4$ der ganzen Säule ausmachte, während die zwei anderen Schichten nur klein waren und so die Vermutung nahelag, es handle sich um Verunreinigungen.

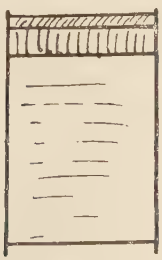


Fig. 5

Die eluierte und ausgearbeitete Schicht c ergab einen gelbgrünen honigartigen Körper, der brennend-bitteren Geschmack besass.

d) Azetylierung. Der durch die chromatographische Analyse gereinigte alkoholische Anteil des Bitterstoffes wurde wie auf Seite 43 angegeben nach *Einhorn* azetyliert. Auch hier erhielten wir wieder geringe Mengen eines hellgelben, hart-brüchigen Körpers, der im Chromatogramm sich als nicht einheitlich erwies (siehe Seiten 43-44).

Aus dem nochmals chromatographisch gereinigten Bitterstoff erhielt man also wieder denselben alkoholischen Anteil wie früher. Er verhält sich auch bei der Azetylierung gleich wie der aus dem weniger reinen Bitterstoff erhaltene. Daraus kann geschlossen werden, dass er als veresterter Anteil im Bitterstoff vorliegt. Wie weit er einheitlich ist, lässt sich nicht entscheiden, da die erhaltene Menge zu einer weiteren Untersuchung zu klein war.

2. Säureanteil.

a) Aussehen. Das erhaltene Säuregemisch stellte eine braune zähe Masse dar, die reichlich mit Kristallen durchsetzt war. Diese Kristalle bildeten kleine Büschel neben Nadeln.

b) Löslichkeit. Mit Ausnahme von Petroläther ist das Säuregemisch in allen organischen Lösungsmitteln löslich. In Petroläther löst sich nur ein Teil der braunen Masse.

So wurde das Gemisch getrennt in:

I. In Petroläther lösliche Säuren.

II. In Petroläther nicht lösliche Säuren.

I. In Petroläther lösliche Säuren. Die so getrennten Säuren stellten eine zähflüssige Masse dar, welche mit Kristallen durchsetzt war. Infolge der geringen Menge Substanz konnte keine Trennung über die Bleisalze gewagt werden, sondern wir versuchten, durch Umkristallisation die eingelagerten Kristalle rein zu bekommen. Dies gelang uns auch. Der Schmelzpunkt der so getrennten Säure betrug *62—63° C.* Sie erwies sich als *Palmitinsäure.*

Mit einem anderen kleinen Teil des in Petroläther löslichen Gemisches versuchten wir eine bromierte Säure darzustellen. Ob-

schon das Gemisch eine positive Permanganat-Reaktion gab, konnte trotzdem keine Bromierung erzielt werden.

Die im unreinen Bitterstoff gefundene α-Linolsäure scheint also abwesend zu sein.

II. In Petroläther nicht lösliche Säuren. Dieser unlösliche Anteil der braun-schwarz und harzig war, zeigte keine kristallinischen Einlagerungen. Diese ganze Masse wurde bei 160—170° C. sublimiert, wobei sich weisse Kristalle bildeten, die einen Schmelzpunkt von *178—179° C.* aufwiesen. Sie waren identisch mit der früher gefundenen Oxysäure.

II. NICHT BITTERE BESTANDTEILE.

1. Alkoholischer Anteil.

Er stellte eine flüssig-honigartige Masse dar, die scharf brennend schmeckte. Da diese alkoholischen Produkte keine Bedeutung haben, sahen wir von einer weiteren Untersuchung ab.

Die von den ätherlöslichen Alkoholen und von den Säuren befreite wässerige Verseifungslösung wurde im Vakuum eingedampft. Es hinterblieb ein klebrig anzufühlendes Kristallgemisch zurück, dessen Geschmack schwach süsslich war. Durch Ausziehen mit kaltem Aethylalkohol konnten geringe Mengen einer hellgelben sirupösen Masse gewonnen werden, welche auf Glyzerin geprüft wurden.

Beim Erhitzen der zu prüfenden Substanz mit Kaliumbisulfat entstanden stechend riechende Dämpfe, welche in Wasser geführt wurden. Diese Lösung reduzierte ammoniakalische Silberlösung und färbte sich auf Zusatz von fuchsinschwefliger Säure schwach rotviolett. Mit Kupfersulfatlösung und Natronlauge gab die Substanz eine blaue, beim Erhitzen unveränderte Flüssigkeit.

Damit war bewiesen, dass die zu untersuchende Substanz Glyzerin war.

2. Säureanteil.

Er stellte eine braune honigartige Masse dar, die auch nur teilweise in Petroläther löslich war.

Der lösliche Anteil bildete eine gelbe, flüssige Masse, die geringe Mengen Kristalle enthielt. Durch Umkristallisieren konnten kleine

Mengen dieser Kristalle gewonnen werden; ihr Schmelzpunkt war 72—73° C. Es handelt sich demnach auf alle Fälle nicht um Palmitinsäure. Bei der früheren Verseifung des Bitterstoffes wurde diese Säure nicht gefunden.

Eine Bromierung des Gemisches führte zu keinem Erfolg, obschon das Gemisch eine positive Permanganat-Reaktion gezeigt hatte, und die Konsistenz das Vorhandensein einer ungesättigten Säure von der Art der α-Linolsäure vermuten liess.

Der unlösliche Anteil war zäh und braun-schwarz. Durch Sublimation konnten keine Kristalle gewonnen werden, sondern die Masse färbte sich unter dem Einfluss der Wärme immer dunkler. Da dieser Säureanteil nur klein war, ist durchaus möglich, dass die früher gefundene α-Linolsäure darin enthalten ist.

Die Parallelverseifung des erneut durch Chromatographie in einen bitteren und einen nicht bitteren Anteil zerlegten Bitterstoffes hat folgendes gezeigt:

1. Von den bei der früheren Verseifung des noch uneinheitlichen Bitterstoffes erhaltenen Produkten sind im erneut gereinigten wieder der Alkoholanteil, die *Palmitinsäure* und die *Oxysäure* $C_{22}H_{36}O_6$ anzutreffen. Sie sind also offenbar im Bitterstoff miteinander verestert. Inwieweit der alkoholische Anteil einheitlich ist, lässt sich noch nicht feststellen. Ebenso kann nicht gesagt werden, ob der Bitterstoff ein Gemisch eines Palmitinsäureesters und eines Esters der Oxysäure ist, oder ob beide Säuren im gleichen Molekül enthalten sind.

2. Die früher (siehe Seite 50) bei der Verseifung des Bitterstoffes gefundene α-Linolsäure stammt nicht aus diesem, sondern aus einer Verunreinigung.

Untersuchung des Sterins

Wie wir gesehen hatten, konnte die kristallinische Masse aus dem bittern Extrakt (siehe Seite 27) mechanisch (Abnutschen, Abfiltrieren) abgetrennt werden. Dabei wurden Kristalle gewonnen, die aus kleinen Blättern bestanden, seidenglänzend aussahen und seifig anzufühlen waren.

Die noch unreinen Kristalle wurden nun mehrmals aus verdünntem Alkohol umkristallisiert, bis sie die ihr zuerst anhaftende gelbe Farbe vollständig verloren hatten und rein weiss waren.

1. Löslichkeitsverhältnisse.

In organischen Lösungsmitteln sind die Kristalle sehr gut löslich, in verdünntem Alkohol nimmt die Löslichkeit mit zunehmender Verdünnung ab, und in Wasser ist der Körper vollständig unlöslich.

Das Aussehen der Kristalle, verbunden mit den Löslichkeitsverhältnissen, liess sofort die Frage aufkommen, ob der von uns gefundene Körper nicht ein Sterin sei. Der qualitative Nachweis erfolgte mit folgenden Farbenreaktionen:

2. Reaktionen.

A. Salkowkische Reaktion. Die Kristalle wurden in Chloroform gelöst und mit dem gleichen Volumen konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Dabei färbte sich die Chloroformlösung blutrot und bald ging die Farbe in Purpurrot über, während die Schwefelsäure grün fluoreszierte[32]).

B. Liebermann-Burchard-Reaktion. Eine Lösung in Chloroform wurde eisgekühlt und mit Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Es entstand eine zuerst rosarote Färbung, die dann in violett-blau überging, um schliesslich dunkelgrün zu bleiben[33]).

C. Tschugaeff-Reaktion. Geringe Mengen wurden in Eisessig gelöst, mit Azetylchlorid und etwas Chlorzink versetzt und einige Minuten gekocht. Es trat eine rosarote Färbung auf[34]).

Aus diesen positiven Reaktionen war zu entnehmen, dass der von uns isolierte kristallinische Körper offenbar ein Phytosterin ist.

1. Schmelzpunkt. Durch nochmaliges Umkristallisieren aus verdünntem Alkohol wurden Kristalle erhalten, deren Schmelzpunkt konstant bei *132—134°* C. lag.

2. Azetylierung. Mittels Essigsäureanhydrid und geschmolzenem Natriumazetat wurde ein Teil des Phytosterins azetyliert, die erhaltenen Kristalle umkristallisiert und der Schmelzpunkt des azetylierten Phytosterins bestimmt. Er lag bei *126—127° C.*

3. Drehung.

Reines Phytosterin $[a]\frac{20^{\circ}}{D} -25{,}25^{\circ}$

Azetyl. Phytosterin $[a]\frac{20^{\circ}}{D} -31^{\circ}$

Das Sterin ist fällbar durch Digitonin. Die oben gefundenen Konstanten stimmen, soviel wir feststellen können, mit keinem bisher gefundenen Sterin überein. Auf eine weitere Untersuchung wurde, weil nicht im Rahmen dieser Arbeit liegend, verzichtet.

IV. Zusammenstellung der Resultate

1. Der durch Chromatographieren des petrolätherischen Auszuges von Rhizoma Calami dargestellte und gereinigte Bitterstoff ist ein honigartiger, gelber, geruchloser, sehr bitter schmeckender Körper.

2. Der Bitterstoff konnte nicht in kristallinische Form gebracht werden.

3. Der Bitterstoff ist entgegen den Angaben von *Geuther* stickstoffrei.

4. Der Befund von *Thoms*, wonach sich der Bitterstoff (Acorin) unter Alkalien- und Säureeinwirkung in ätherisches Oel, eine Harzsäure und in einen Fehlingsche Lösung reduzierenden Körper spaltet, konnte nicht bestätigt werden.

5. Entgegen den Angaben von *Thoms* und *Geuther* konnte nachgewiesen werden, dass der Bitterstoff ein Ester ist. Er wird bei der Alkalihydrolyse gespalten in:
   a) einen alkoholischen Anteil, der zähflüssig ist und dessen Einheitlichkeit und Zusammensetzung nicht festgestellt werden konnten;
   b) zwei Säuren: 1. Palmitinsäure; 2. eine Oxysäure $C_{22}H_{36}O_6$.

6. Da der erhaltene Bitterstoff sich als noch nicht einheitlich erwies, können aus den Spaltprodukten keine Rückschlüsse auf seine Zusammensetzung gezogen werden.

7. Die Droge enthält ein Phytosterin mit folgenden Konstanten:

Reines Phytosterin, Schmelzpunkt 132—134° C. $[a]_D^{20°}$ —25,25°

Azetyl Phytosterin, Schmelzpunkt 126—127° C. $[a]_D^{20°}$ —31°

Literaturverzeichnis

[1]) *Thoms u. Beckstroem.* Ber. chem. Ges. 1901, 34. 1021.
Ber. chem. Ges. 1902, 35. 3187—3195.
[2]) *Schimmel.* Ber. 1889, Okt. 8.; 1901, April 13.
v. Soden und Rojahn. Pharm. Ztg. 1901, 46. 243.
[3]) *Kurbatow.* Ber. chem. Ges. 1873, 6. 1210.
Ann. der Chem. 1874, 174. 4.
[4]) *Schimmel.* Siehe Note 2.
[5]) *Flückiger.* Pharmakognosie. 1891, 352.
[6]) *Semmler und Spornitz.* Ber. chem. Ges. 1913, 46. 3700.
Thoms u. Beckstroem. Ber. chem. Ges. 1913, 46. 3946.
Schimmel. Berichte. 1914, Apr. 33.
[7]) *Thoms.* Arch. Pharm. 1886, 24. 465.
[8]) *Thoms.* Pharm. Ztg. 1887, 32. 304.
Ann. Chem. 1887, 242. 257.
[9]) *Thoms.* Pharm. Ztg. 1888, 29. 290.
[10]) *Geuther.* Arch. Pharm. 1887, 225. 43.
Kunz. Arch. Pharm. 1888, 226. 529.
[11]) *Gutzeit.* Pharm. Ztg. 1887, 32. 225.
Geuther. Ann. Chem. 1887, 240. 92.
[12]) *Thoms.* Pharm. Zentralhalle. 1887, 28. 231.
Kunz und Geuther. Siehe Note 10.
[13]) *Gutzeit.* Pharm. Ztg. 1887, 32. 289.
[14]) *A. Faust.* Arch. der Pharm. 1867, 132—214.
[15]) *Husemann's.* Die Pflanzenstoffe (I 414), II. Auflage.
[16]) *Thoms.* Arch. der Pharm. 1886, 11. 224.
[17]) *Thoms.* Arch. der Pharm. 1886, 11. 224 und 467.
[18]) *A. Kurbatow.* Ber. der Chem. Ges. 1873, II. 1210.
[19]) *A. Geuther.* Ann. der Chem. 1887, 92. 240.
[20]) *Dumas.* Stickstoffbestimmung. A. chim. phys. 2, 198. 1831.
[21]) *Thoms.* Pharm. Zentralhalle. 1888, 24. 290.
[22]) *G. Draggendorf.* Die qual. und quantit. Analyse von Pflanzen und Pflanzenteilen. Göttingen 1882.
[23]) *Kunz.* Arch. der Pharm. 1888, 226. 529.
[24]) *Zechmeister u. Cholnoky.* Chromat. Analys. J. Springer 1937.
Wintersteier u. Schön. Chromat. Analys.
Karrer und Schöpf. Chromat. Analys.
[25]) *Beckstroem.* Dissert. Basel. 1902.
[26]) *Lassaigne.* C. r. 16, 387. 1843.
[27]) *Dumas.* H. Chim. Phys. 2, 198. 1831.
[28]) *Einhorn.* Hollandt A. 301, 95. 1898.
[29]) *Eng.* Bd. 13, Seite 806, 1921.
Grün. Bd. 1, Seite 220, 1925.
[30]) *Kekule.* Spl. A. 1, 340. 1861.
[31]) *Rast.* B. 55. 1051—3727. 1922.
[32]) *Pflügers.* Arch. f. d. ges. Physiol. 6, 207. 1872.
[33]) *Burchard.* Dissert. Rotstock 1889. B. 18, 1804. 1885.
[34]) Ref. Z. f. angew. Che. 618, 1900.

Weiter wurden verwendet:

Flückiger. Pharmakogn. des Pflanzenreiches. 1891. 348.
Zörning. Arzneidrogen I 1909. 509.